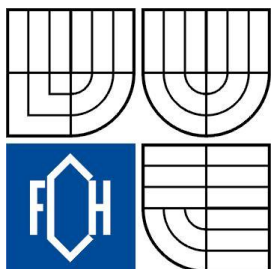


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ



**FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ**

**ZMENY PRODUKCIE PROTEÓMU A METABOLÓMU
VYBRANÝCH ORGANIZMOV V STRESOVÝCH
PODMIENKACH**

DIZERTAČNÁ PRÁCA

AUTOR

Ing. ANDREA HALIENOVÁ

ŠKOLITEĽ

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2010



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

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0011/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Ing. Andrea Halienová	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (P2805)	
Studijní obor:	Chemie životního prostředí (2805V003)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název dizertační práce:

Změny proteomu a metabolomu u vybraných organismů ve stresových podmínkách

Zadání dizertační práce:

1. Rešerše - využití proteomické a metabolické analýzy k charakterizaci intracelulárních změn vyvolaných stresovými podmínkami.
2. Karotenogenní kvasinky:
 - a) kultivace ve stresových podmínkách za účelem řízené nadprodukce pigmentů
 - b) izolace a separace kvasinkových proteinů
 - c) analýza proteomu stresovaných kvasinek pomocí 1D a 2D elektroforézy a hmotostní spektrometrie
 - d) interpretace proteomických dat
 - e) analýza metabolomu karotenogenních kvasinek
3. Analýza antioxidačních enzymů a dalších metabolitů v rostlinném materiálu.

Termín odevzdání dizertační práce: 30.6.2010

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

Ing. Andrea Halienová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.3.2010

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

licenční zmluva

ABSTRAKT

Životné podmienky každého organizmu sú v dnešnej dobe ovplyvnené rôznymi faktormi. Niektoré vplyvajú na organizmus pozitívne, iné negatívne. Schopnosť odolávať zmeneným metabolickým a životným podmienkam a adaptovať sa je základnou podmienkou pre prežitie. Každý aj ten najmenší vplyv sa prejaví na zmenách metabolizmu, avšak organizmy majú schopnosť vyvinúť si dostatočné mechanizmy stresovej odozvy. Niektoré sú spoločné alebo veľmi podobné pre celý živý svet (produkcia enzýmov a niektorých endogénnych stresových metabolitov primárneho metabolizmu), zatiaľ čo iné sú špecifické pre určitý druh organizmu či typ stresu. Stresová odozva bunky môže byť sledovaná na rôznej úrovni (proteomická, genomická, metabolická) a za vhodných podmienok je priemyselne využiteľná.

Cieľom práce bolo štúdium rôznych stresových faktorov, ktoré boli aplikované na vybrané organizmy – karotogénne kvasinky a rastlinné materiály. Stresová odozva u kvasiniek vyvolaná vplyvom osmotického a oxidačného stresu bola sledovaná najmä na proteomickej úrovni a na produkcii vybraných sekundárnych metabolitov. Zvolená metodika pre proteomickú analýzu kombinovala separáciu proteínov pomocou 1D a 2D elektroforézy s následnou analýzou vybraných proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie. Najlepšia adaptácia na stresové podmienky spojená s cieľovou nadprodukciou metabolitov – karotenoidov, bola zistená u kvasinky *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26. Tieto zistenia sú vhodným predpokladom pre budúce priemyselné využitie biotechnologickej produkcie karotenoidov. U rastlinných vzoriek bola pozornosť venovaná najmä enzýmom a metabolitom, ktoré boli zapojené v antioxidačnej odozve.

ABSTRACT

Living conditions of every organism are influenced by various factors at this time. Some of them have positive effect on organism, some negative. Basic condition for surviving is the ability to resist and adapt to changing metabolic and living conditions. Every single stress effect can lead to changes in metabolism but organisms have ability to develop sufficient mechanisms for stress response. Some of them are similar for all living organisms (enzyme production, endogenous primary stress metabolites) some of them are specific for certain organism or stress type. Cell stress response can be observed on different levels (proteomic, genomic, metabolomic). In proper conditions it can be used industrially.

In this work, influences of various stress factors were studied. These factors were applied on selected organisms – carotenogenic yeast and plant materials. Yeast stress response was induced by osmotic and oxidation stress factors. Changes on proteomic level and in production of selected secondary metabolites were observed. Proteome was analyzed by 1D and 2D electrophoresis with subsequent analysis of proteins by mass spectrometry. Yeast strain *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26 showed the best adaptation to stress factors, which was moreover accompanied by overproduction of carotenoids. This finding can be premise for next industrial production of carotenoids. In plant samples predominantly enzymes and metabolites involved in antioxidant response were studied.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

proteíny, kvasinky, environmentálny stres, antioxidantné enzýmy, 1D elektroforéza, 2D elektroforéza, MS

KEYWORDS

proteins, yeast, environmental stress, antioxidant enzymes, 1D electrophoresis, 2D electrophoresis, MS

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	TEORETICKÁ ČASŤ	13
1.1	PROTEOMIKA, GENOMIKA, METABOLOMIKA A ICH VZŤAH	13
1.2	VPLYV STRESOVÝCH FAKTOROV NA METABOLIZMUS MIKROORGANIZMOV A INÝCH ORGANIZMOV	14
1.2.1	<i>Produkcia proteínov a iných metabolitov v stresových podmienkach</i>	<i>15</i>
1.2.1.1	Vplyv teploty	15
1.2.1.2	Vplyv osmotického stresu	16
1.2.1.3	Vplyv chemického stresu	16
1.2.1.4	Vplyv viacerých stresových faktorov na bunky	18
1.3	KAROTOGÉNNE KMENE KVASINIEK	19
1.3.1	<i>Čeľaď Rhodotorulaceae</i>	<i>19</i>
1.3.1.1	Rod Rhodotorula	19
1.3.1.2	Rod Cystofilobasidium	20
1.3.2	<i>Čeľaď Sporobolomycetaceae</i>	<i>20</i>
1.4	ENZÝMY ZAPOJENÉ DO STRESOVEJ ODOZVY U MIKROORGANIZMOV A RASTLÍN	20
1.4.1	<i>Antioxidačné enzýmy</i>	<i>20</i>
1.4.1.1	Kataláza (CAT, EC 1.11.1.6)	20
1.4.1.2	Superoxiddismutáza (SOD, EC 1.15.1.1.)	21
1.4.1.3	Peroxidáza (EC 1.11.1.7.)	21
1.4.2	<i>Enzýmy ovplyvňujúce senzorické vlastnosti potravín</i>	<i>21</i>
1.4.2.1	Polyfenoloxidáza (PPO, EC 1.14.18.1.)	21
1.4.2.2	Lipoxygenáza (LOX, EC 1.13.11.12.)	22
1.5	NEENZÝMOVÉ ANTIOXIDAČNÉ LÁTKY	22
1.5.1	<i>Karotenoidy</i>	<i>22</i>
1.5.2	<i>Polyfenoly</i>	<i>23</i>
1.6	METÓDY ISOLÁCIE PROTEÍNOV Z BIOLOGICKÝCH MATERIÁLOV	23
1.6.1	<i>Proteíny – ich štruktúra a stabilita</i>	<i>24</i>
1.6.2	<i>Prehľad možných metód dezintegrácie buniek</i>	<i>24</i>
1.6.2.1	Mechanická dezintegrácia	26
1.6.2.2	Nemechanické metódy dezintegrácie	27
1.6.3	<i>Dôležité faktory pri izolácii bielkovín</i>	<i>27</i>
1.6.4	<i>Purifikácia proteínov po vyizolovaní</i>	<i>29</i>
1.6.5	<i>Tandemová afinitná purifikácia ako účinný nástroj v purifikácii proteínov</i>	<i>31</i>
1.7	METÓDY ANALÝZY PROTEÍNOV VO VZORKÁCH	32
1.7.1	<i>Stanovenie celkového obsahu proteínov vo vzorke</i>	<i>32</i>
1.7.1.1	Biuretova metóda	33
1.7.1.2	Lowryho metóda	33
1.7.1.3	Bradfordova metóda	33
1.7.1.4	Stanovenie z UV spektra	33

1.7.2	Metódy pre identifikáciu proteínov	33
1.7.3	Enzýmová analýza	34
1.8	ELEKTROFORETICKÉ SEPARAČNÉ METÓDY	34
1.8.1	Nosiče v elektroforéze	35
1.8.2	Aparatúry	35
1.8.3	Gélové elektroforetické metódy	36
1.8.3.1	Disková (diskontinuálna) elektroforéza	36
1.8.3.2	Gradientová gélová elektroforéza	36
1.8.3.3	Prídavné látky v elektroforéze	36
1.8.3.4	SDS elektroforéza	36
1.8.3.5	Izoelektrická fokusácia	37
1.8.3.6	Western blotting	37
1.8.3.7	Dvojdimenziálna elektroforéza (2-DE)	39
1.9	PRÍPRAVA VZORIEK PRE ANALÝZU ŠTRUKTÚRY PROTEÍNOV	41
1.10	HMOTNOSTNÁ SPEKTROMETRIA	42
1.10.1	Hmotnostná spektrometria MALDI-TOF-MS	42
1.10.1.1	História a súčasnosť MALDI-TOF	42
1.10.1.2	Príprava vzorky	43
1.10.1.3	Princíp analýzy	44
1.10.2	Tandemová hmotnostná spektrometria MS/MS	46
1.10.3	LC/MS	46
1.10.4	Analýza peptidov pomocou MS	47
1.11	MIKROFLUIDNÉ TECHNIKY	47
1.11.1	Kontrola toku tekutiny v mikročipe	48
1.11.2	Detekcia v mikrofluidných technikách	49
1.11.3	Zhodnotenie mikrofluidných techník	49
1.12	PROTEOMIKA A ŽIVOTNÉ PROSTREDIE	49
1.13	METABOLOMICKÁ STRESOVÁ ANALÝZA	50
3	CIEĽ PRÁCE	52
4	MATERIÁL A METODICKÉ POSTUPY	53
4.1	MIKROBIÁLNE KMENE, MATERIÁL, CHEMIKÁLIE A PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE	53
4.1.1	Kvasinkové kmene	53
4.1.2	Rastlinný materiál	53
4.1.2.1	Jablká	53
4.1.2.2	Jačmene a slady	53
4.1.3	Chemikálie	54
4.1.3.1	Štandardy	54
4.1.3.2	Špeciálne chemikálie – analýza bielkovín	54
4.1.3.3	Chemikálie na analýzu enzýmov	54
4.1.3.4	Rozpúšťadlá HPLC	54
4.1.3.5	Kultivačné médiá	54
4.1.4	Použité prístroje a pomôcky	55

4.1.4.1	Zostavy pre elektroforézu bielkovín a western blot.....	55
4.1.4.2	Zostava pre HPLC a MS.....	55
4.1.4.3	Ostatné prístroje	56
4.2	PRODUKCIA MIKROBIÁLNEJ BIOMASY.....	56
4.2.1	<i>Kultivačné podmienky</i>	56
4.2.1.1	Kultivácia kvasinkových kmeňov.....	56
4.2.1.2	Kultivácia v prítomnosti stresových faktorov.....	57
4.2.1.3	Kultivácia porovnávacích kmeňov	58
4.2.1.4	Spracovanie biomasy.....	58
4.2.2	<i>Dlhodobé uchovávanie mikroorganizmov</i>	58
4.2.3	<i>Test životnosti kvasiniek</i>	58
4.3	METÓDY POUŽITÉ K IZOLÁCII PROTEÍNOV Z KOMPLEXNÝCH VZORIEK.....	58
4.3.1	<i>Kvasinky</i>	58
4.3.1.1	Optimalizácia izolačných techník.....	58
4.3.1.2	Izolácia proteínov pomocou NaOH	59
4.3.1.3	Izolácia proteínov pomocou SDS	60
4.3.1.4	Izolácia proteínov pomocou TCA	60
4.3.1.5	Príprava vzoriek proteínov z kvasiniek pre analýzu pomocou mikročipovej elektroforézy	60
4.3.2	<i>Jablká</i>	60
4.3.2.1	Príprava vzoriek pre analýzu proteínov	60
4.3.2.2	Príprava vzoriek pre analýzu antioxidačných enzýmov.....	61
4.3.3	<i>Jačmeň a slad</i>	61
4.4	ANALÝZA INTRACELULÁRNYCH BIELKOVÍN	61
4.4.1	<i>Hartree-Lowryho metóda stanovenia celkových proteínov</i>	61
4.4.2	<i>Bradfordova metóda stanovenia celkových proteínov</i>	62
4.4.3	<i>Elektroforéza intracelulárnych bielkovín pomocou 1D PAGE-SDS</i>	62
4.4.2.1.	Roztoky	63
4.4.2.2.	Príprava polyakrylamidového gélu.....	63
4.4.2.3.	Príprava vzoriek	64
4.4.2.4.	Prevedenie vertikálnej elektroforézy	64
4.4.2.5.	Farbenie.....	64
4.4.2.6.	Vyhodnotenie	65
4.4.4	<i>Western blot</i>	66
4.4.5	<i>Mikrofluidné elektroforetické systémy</i>	66
4.4.5.1	Zariadenie Experion pre stanovenie bielkovín mikrofluidnou technikou	66
4.4.5.2	Príprava vzoriek a roztokov.....	67
4.4.2.3.	Nanášanie gélu a vzoriek na čip, priebeh analýzy	68
4.4.2.4.	Analýza dát.....	69
4.4.6	<i>2D elektroforéza</i>	69
4.4.6.1	Príprava vzorky na 2D analýzu	69
4.4.6.2	Izoelektrická fokusácia.....	69
4.4.6.3	PAGE-SDS a farbenie gélu	70
4.4.6.4	Analýza obrazu.....	71

4.4.7	<i>Analýza proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie</i>	71
4.4.7.1	Príprava vzorky pred MS analýzou	71
4.4.7.2	MS analýza.....	71
4.4.8	<i>Analýza antioxidačných enzýmov</i>	73
4.4.8.1	Antioxidačné enzýmy v jablkách.....	73
4.4.8.2	Antioxidačné enzýmy v jačmeni a v slade.....	74
4.5	<i>IZOLÁCIA A ANALÝZA OSTATNÝCH ANTIOXIDAČNÝCH LÁTKO V KOMPLEXNÝCH VZORKÁCH</i>	74
4.5.1	<i>Spracovanie vzoriek pred analýzou</i>	74
4.5.2	<i>Analýza celkových polyfenolov</i>	75
4.5.3	<i>Analýza celkových flavonoidov</i>	75
4.5.4	<i>Metóda ABTS</i>	75
4.5.5	<i>Analýza nízkomolekulárnych antioxidačných látok metódou HPLC/UV-VIS a HPLC/PDA/ESI-MS</i> ..	76
5	VÝSLEDKY	78
5.1	<i>ANALÝZA PROTEÍNOV A ANTIOXIDAČNÝCH LÁTKO IZOLOVANÝCH Z KVASINKOVÝCH MIKROORGANIZMOV</i>	78
5.1.1	<i>Morfológia a rastové charakteristiky použitých kmeňov kvasiniek</i>	78
5.1.1.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	79
5.1.1.2	<i>Rhodotorula rubra a Rhodotorula aurantiaca</i>	80
5.1.1.3	<i>Sporobolomyces salmonicolor, Sporobolomyces roseus a Sporobolomyces shibatanus</i>	83
5.1.1.4	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	87
5.1.2	<i>Analýza proteómu kvasinkových mikroorganizmov metódou 1D PAGE-SDS</i>	88
5.1.2.1	<i>Optimalizácia izolačných podmienok</i>	89
5.1.2.2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	93
5.1.2.3	<i>Rhodotorula rubra</i>	95
5.1.2.4	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	97
5.1.2.5	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	99
5.1.2.6	<i>Sporobolomyces roseus</i>	100
5.1.2.7	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	102
5.1.2.8	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	104
5.1.2.9	<i>Porovnanie proteínových profilov u všetkých testovaných kmeňov</i>	105
5.1.3	<i>Analýza proteómu kvasinkových mikroorganizmov metódou mikročipovej elektroforézy</i>	106
5.1.3.1	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	106
5.1.3.2	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	108
5.1.4	<i>Analýza proteómu kvasinkových mikroorganizmov metódou 2D elektroforézy a následná identifikácia vybraných proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie</i>	109
5.1.4.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	109
5.1.4.2	<i>Rhodotorula rubra</i>	114
5.1.4.3	<i>Identifikácia proteínov</i>	119
5.1.5	<i>Analýza antioxidačných látok v kvasinkových mikroorganizmoch</i>	134
5.1.5.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	135
5.1.5.2	<i>Rhodotorula rubra</i>	136
5.1.5.3	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	137

5.1.5.4	Sporobolomyces salmonicolor	138
5.1.5.5	Sporobolomyces roseus	139
5.1.5.6	Sporobolomyces shibatanus	140
5.1.5.7	Cystofilobasidium capitatum	141
5.2	ANALÝZA PROTEÍNOV A ANTIOXIDAČNÝCH LÁTOK V RASTLINNÝCH VZORKÁCH	143
5.2.1	<i>Analýza proteínov z rastlinných vzoriek</i>	143
5.2.1.1	Hartree-Lowryho metoda	143
5.2.1.2	Analýza proteínov v jablkách pomocou mikročipovej elektroforézy	144
5.2.1.3	Analýza proteínov v jablkách pomocou 1D elektroforézy	147
5.2.1.4	Analýza proteínov v jablkách pomocou Western Blotu	148
5.2.2	<i>Enzymová analýza</i>	149
5.2.2.1	Analýza antioxidačných enzýmov vo vzorkách jablák	149
	Stanovenie SOD	149
	Stanovenie CAT	150
	Stanovenie PPO	152
	Porovnanie enzýmov v jednotlivých odrodách	153
5.2.2.2	Analýza antioxidačných enzýmov vo vzorkách jačmeňov a sladov	155
	Stanovenie LOX	155
5.2.3	<i>Analýza ostatných antioxidačných látok z rastlinných vzoriek</i>	159
5.2.3.1	Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity	159
	Jablká	159
	Jačmene a slady	160
5.2.3.2	Stanovenie celkových polyfenolov	161
	Jablká	161
5.2.3.3	Stanovenie celkových flavonoidov	162
	Jablká	162
6	DISKUSIA	166
7	ZÁVERY	172
8	ZOZNAM SKRATIEK	175
9	POUŽITÁ LITERATÚRA	176
10	PRÍLOHY	184

1 ÚVOD

Všetky živé organizmy sú v priebehu svojej existencie vystavené rôznym druhom stresu, endogénneho i exogénneho. Schopnosť odolávať zmeneným metabolickým a životným podmienkam a adaptovať sa je potom základnou podmienkou pre prežitie a často aj významným evolučným faktorom. U živých organizmov bol postupne vyvinutý rad mechanizmov stresovej odozvy, z ktorých niektoré sú spoločné alebo veľmi podobné pre celý živý svet (produkcia enzýmov a niektorých endogénnych stresových metabolitov primárneho metabolizmu), zatiaľ čo iné sú špecifické pre určitý druh organizmu či typ stresu. Stresovú odozvu možno sledovať na rôznej úrovni (genomická, proteomická, metabolická) a niekedy môžu byť stresové mechanizmy aj priemyslovo využité.

Aktuálnym trendom v hodnotení vplyvu stresových faktorov na organizmus je analýza proteómu. Každá aj malá zmena sa prejaví na zmene proteínového zloženia, alebo dochádza k zmene expresie proteínov. Tieto zmeny sú najlepšie viditeľné porovnávaním proteínového zloženia kontrolných vzoriek so vzorkami stresovanými, kde sa na získanie proteínových profilov používa 2D elektroforéza, ktorá rozdelí proteíny na základe ich pI a molekulovej hmotnosti. Vybrané spoty bielkovín sa následne analyzujú pomocou hmotnostnej spektrometrie a porovnávaním s proteínovými knižnicami sa postupne zisťuje náš cieľový proteín. Je však potrebné podotknúť, že rýchla analýza proteínov vyššie spomenutými metódami je možná najmä u organizmov, ktoré už majú sekvenovaný genóm, tj. u vedeckých kmeňov kvasiniek. U priemyselných kmeňov je situácia horšia a presná identifikácia proteínu často nie je možná a výsledky sú len približné, na základe porovnania s už existujúcimi proteínmi.

Zmeny proteómu odrážajú reálnu situáciu v bunke a akceptujú všetky mechanizmy zapojené v produkcii proteínov vrátane posttranslačných modifikácií. Zmeny produkcie a funkcie metabolických enzýmov sa potom priamo prejaví v zmene zloženia metabolitov, čo je ďalšia možnosť, ako sledovať priebeh stresovej odozvy. Analýza zmien produkcie vybraných stresových metabolitov môže byť špecifickejšia, ale má obmedzenejšiu výpovednú hodnotu. Čo je však veľmi dôležité, môže byť využitá priemyslovo, pokiaľ študovaný metabolit má potenciálne technologické aplikácie. Stresové mechanizmy využiteľné v biotechnologických výrobách sa v súčasnej dobe uplatňujú hlavne u mikroorganizmov a rastlín.

Vhodné je využitie takých mikroorganizmov, ktoré prirodzene produkujú žiadaný metabolit. Z priemyselného hľadiska je však potrebné, aby obsah metabolitu bol čo najvyšší. To sa dá dosiahnuť cielenou zmenou genómu alebo ovplyvnením životných podmienok látkami, ktoré dokážu vyvolať nadprodukcii nami želaného metabolitu. U červených druhov kvasiniek sú žiadanými metabolitmi karotenoidy, ktoré majú antioxidačný charakter. Cielenou aplikáciou exogénnych látok do živného média je možné u kvasinkových buniek vyvolať stresovú reakciu, ktorej výsledkom je zvýšená produkcia karotenoidov. Je však potrebné sledovať vplyv stresových látok na bunku ako takú. Znalosť fyziológie buniek ide ruka v ruku s každou zmenou podmienok. Poznanie metabolizmu kvasiniek po aplikácii stresových faktorov, alebo aspoň schopnosť rozpoznať a určiť zmeny, ktoré v metabolizme nastali, je jedným zo základných predpokladov úspešnej produkcie.

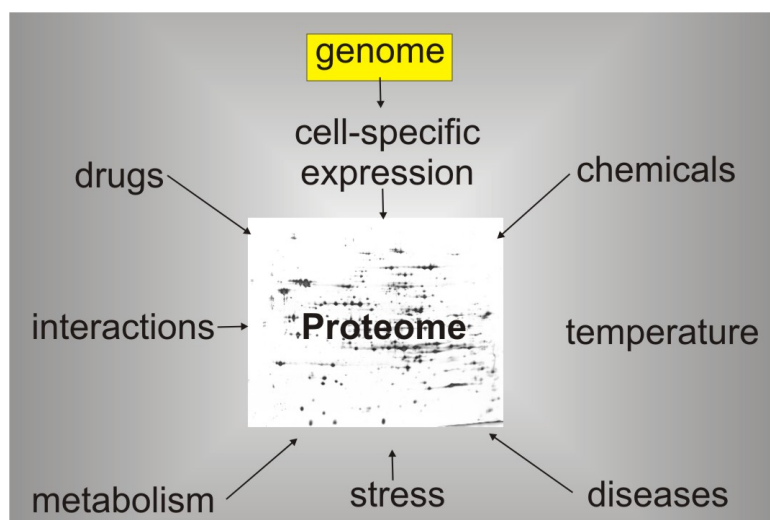
Vylepšenia technologických procesov sa netýkajú len mikroorganizmov. Zatiaľ čo u kvasiniek sa jedná o navýšenie produkcie vybraných metabolitov, u rastlinných vzoriek ide najmä o zachovanie maximálnej čerstvosti a uchovateľnosti živín a antioxidačných látok v čase, s dôrazom na zachovanie organoleptických vlastností potravín. Sledovaním zmien obsahu antioxidačných látok a aktivity antioxidačných enzýmov sa dá odsledovať vplyv okolia na rastlinné vzorky, pričom je následne možné navrhnúť vylepšené spôsoby uchovávania existujúcich druhov, či genetickou modifikáciou vyšľachtiť nové odrody a druhy, ktoré môžu byť následne odolnejšie voči vonkajším vplyvom už počas rastu, či následnej distribúcie a uchovávania.

Pozitívom je, že nové biotechnológie a vylepšenia technologických postupov sa postupne zapracovávajú aj do praxe, pričom ich dopad na životné prostredie je oveľa menší než pri zastaralých procesoch.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

1.1 Proteomika, genomika, metabolomika a ich vzťah

Medzi uchovanou genetickou informáciou – génom a funkčným reprezentantom – proteómom prebieha niekoľko vysoko komplexných dejov, ako je transkripcia génovej sekvencie a translácia v proteíny, transportné javy i posttranslačné modifikácie. Zatiaľ čo genóm je systém statický, až konštantný, proteóm je systém dynamický. Proteóm je chápaný ako kvantitatívny súbor proteínov v bunke alebo v organizme za presne definovaných podmienok. Proteóm je vysoko dynamický systém v porovnaní s genómom najmä preto, že akýkoľvek environmentálny alebo biologický parameter ovplyvňuje expresiu proteínu. Koncentrácie jednotlivých proteínov sa menia podľa aktuálnych potrieb organizmu [1, 2].



Obr. 1 Ukážka dynamiky proteómu [3]

Znalosť genómu je základom pre porozumenie funkcie génov, ktoré prebiehajú v bunkách. Avšak tieto dáta opisujú len statický stav zdedenej informácie. Pre porozumenie dynamických procesov v bunke, napríklad počas diferenciácie bunky a regulácie, je dôležité preštudovať aj proteíny, ktoré sú zahrnuté. Ich prítomnosť, aktuálna koncentrácia a možné modifikácie musia byť známe, aby bolo možné zistiť ich funkčné aktivity. To znamená, že sú analyzované celé bunkové extrakty, aby bolo možné získať stupne expresie proteínov za určitých podmienok [4].

Proteóm je študovaný priebežne v rôznych fyziologických situáciách. Tie odhaľujú odlišnú expresiu proteínov za rôznych situácií – nastávajú rozdiely v molekulových dráhach. Mnoho faktorov môže ovplyvniť expresiu proteínov, medzi ne patrí napríklad stres, zmeny teploty, rôzne kultivačné podmienky a pod [4].

Hlavným cieľom proteomiky je získanie proteínovej mapy. Proteínovou mapou sa nazýva dvojrozmerný obraz znázorňujúci proteíny ako škvrny – spoty, ktorých integrálna absorbanca je mierou ich koncentrácie za daných podmienok. Vytvorenie proteínovej mapy pomocou 2D elektroforézy, charakterizácia jednotlivých proteínov, ich identifikácia v databázach a obrazová

analýza 2D gélov umožňuje prevádzkať experimenty, pri ktorých je porovnané komplexné proteínové zloženie vzorky za rôznych podmienok [2]. Identifikácia proteínu prítomného vo vzorke je len prvým krokom v dlhom procese porozumenia funkcie jednotlivých proteínov, pretože je známe, že diverzita biologických procesov je riadená intermolekulovými interakciami v bunke. Preto úspešný model funkcie proteínov a ich regulácie vyžaduje široké porozumenie a dôkladné mapovanie molekulových interakcií s inými proteínmi a ligandami [5, 6].

V posledných rokoch sa začína často skloňovať aj slovo metabolomika. Toto slovo zahŕňa globálny metabolový profil v systéme (bunka, tkanivo, organizmus) za daných konkrétnych podmienok. Analýza metabolómu je výzvou kvôli širokej chemickej povahe metabolitov. Metabolity sú výsledkom interakcie génomu organizmu s jeho prostredím a nie sú len konečným produktom génovej expresie, ale tiež tvoria súčasť regulačného systému organizmu. Metabolomika je jedna z nových vied pripájajúca sa k už zavedenej genomike, proteomike či transkriptomike ako veda, ktorá dopĺňa celkové porozumenie globálnej systémovej biológie. Vďaka prepojeniu s ostatnými spomínanými vedami umožňuje väčšie porozumenie biologických systémov. Metabolomika detekuje a kvantifikuje nízkomolekulárne molekuly známe ako metabolity, produkované aktívnymi živými bunkami za rôznych podmienok počas ich životného cyklu [7].

1.2 Vplyv stresových faktorov na metabolizmus mikroorganizmov a iných organizmov

Väčšina organizmov rastie za špecifických podmienok. Ak však nastanú nepriaznivé podmienky, mikroorganizmy majú schopnosť sa týmto podmienkam prispôbiť. Stres vyvolaný týmito podmienkami, je náhla environmentálna zmena, ktorá zahŕňa poškodenia na molekulovej, bunkovej aj organizmovej úrovni. Zmeny, ktoré môžu v bunke nastať, nie sú len enzýmového charakteru, ale bunka je schopná do určitej miery zmeniť svoje chemické zloženie alebo tvar, aby boli bunky voči novému prostrediu odolnejšie. Mikroorganizmy rastúce za iných než fyziologických podmienok vykazujú rad tzv. stresových odpovedí (Tab. 1). Tieto vedú k modulácii enzýmových aktivít a ku zmene génovej expresie a prejavia sa okrem iného aj zmenami proteómu. Všetky tieto schopnosti mikroorganizmov sú obmedzené určitou hranicou, za ktorou dochádza k zastaveniu rastu alebo k usmrteniu bunky. Na druhej strane výhodným efektom stresu je schopnosť organizmu adaptovať sa a zvládnuť stresové podmienky. Táto schopnosť sa nazýva stresová tolerancia. Regulácia stresovej odozvy zahŕňa transkripčné, posttranskripčné a posttranslačné mechanizmy, z ktorých najviac preštudované sú doteraz mechanizmy transkripčné [8-11].

Tab. 1 Prehľad stresových faktorov [8]

Environmentálne stresové faktory
<i>Fyzikálny stres</i>
Teplotný šok
Osmotický šok
Vysušenie/dehydratácia
Vysoký hydrostatický tlak

Strážné sily
Žiarenie
Chemický stres
Ethanol a iná metabolitová toxicita
Limitácia živín
Oxidačný stres
pH šok
Stres spôsobený kovovými iónmi
Chemická mutagenéza
Biologický stres
Stárnutie bunky
Zmeny genotypu
Súťaživosť s inými organizmami

Odozva bunky voči vplyvom stresových faktorov je evolučne zachovaná vo všetkých živých organizmoch, pričom hlavná úloha v zabezpečení ochrany voči stresu sa pripisuje „heat-shock“ proteínom a iným molekulám [10].

Výskum proteómu dovoľuje asociáciu jednotlivých proteínov s úmrtím bunky. Tieto proteíny môžu primárne slúžiť ako biomarkery pre prípad smrti bunky. Porovnanie proteínových máp organizmu za stresových podmienok s organizmom za normálnych podmienok umožňuje detekciu špecifických zmien v proteóme. Identifikácia proteínov, ktoré sú stresom indukované alebo potlačené, umožňuje zistiť molekulové mechanizmy stresovej odozvy [12].

Analýza zmien proteómu, vzniknutých za stresových podmienok, začína samotnou kultiváciou buniek. Bunky sú pri raste vystavené skúmaným stresovým podmienkam. Po náraste buniek nastáva ich dezintegrácia. Získaný bunkový extrakt je po prečistení a odstránení interferujúcich látok separovaný pomocou 2-DE. Získaná proteínová mapa je porovnaná s mapou získanou za nestresových podmienok. Jednotlivé rozdielne škvrny bielkovín sú ďalej analyzované pomocou hmotnostnej spektrometrie, najčastejšie MALDI-TOF. Dáta získané z MS analýzy sú porovnávané s proteínovými databázami. Získané identifikované proteíny a ich rozdielne expresie umožňujú zistiť aspoň náznak toho, ako funguje odozva organizmu na stresové podmienky [13].

1.2.1 Produkcia proteínov a iných metabolitov v stresových podmienkach

Každý živý organizmus vykazuje molekulovú odozvu voči nepriaznivým podmienkam. Keďže rôzne druhy stresu majú podobné efekty, môžeme tieto odozvy považovať za všeobecnú bunkovú odozvu voči metabolickým narušeniam. Poznanie adaptačných mechanizmov počas pôsobenia stresu je dôležitý nielen z vedeckého ale aj z biotechnologického významu [14].

1.2.1.1 Vplyv teploty

Vplyv vyššej teploty na bunky vedie k ich denaturácii – dochádza k rozpadu vodíkových väzieb a rušeniu hydrofóbných interakcií. Čím vyššia teplota na bunky pôsobí, tým k väčšiemu

poškodeniu dôjde. Vplyvom zvýšených teplôt prejavujú mikroorganizmy komplexnú molekulárnu odozvu. Táto odozva sa nazýva „heat-shock response“ a je regulačným fenoménom vo všetkých živých bunkách. Pôsobenie vyšších teplôt na kvasinky vedie k syntéze špecifických skupín proteínov, tzv. „heat-shock“ proteínov (hsp). Hsp sú často uvádzané ako stresové proteíny a ich regulácia je niekedy opisovaná ako jeden z mechanizmov všeobecnej stresovej odozvy [8].

„Heat-shock“ proteíny sú zapojené vo všetkých dôležitých procesoch spojených s rastom, ako napríklad bunkové delenie, syntéza DNA, transkripcia, translácia, zvinutie proteínov a ich transport, či funkcia membrán. Ako príklad slúžia hsp70, ktorý je mediátorom zvinutia proteínov, hsp60 je chaperonín (podporuje posttranslačné hromadenie polypeptidov), či hsp83, ktorý patrí do skupiny proteínov hsp90, ktorých gény kódujú tiež chaperónové proteíny [14].

Vplyv nízkych teplôt na smrť buniek je stále nevyjasnený. Prežitie nízkych teplôt závisí na genetických, fyziologických a environmentálnych faktoroch. Napríklad pri uchovávaní buniek za nízkych teplôt (tekutý dusík, -196°C) je dôležitý postup mrazenia a potom aj postupného rozmrazovania. Záleží tiež na prítomnosti alebo neprítomnosti ochranných látok – glycerol a trehalóza znižujú vplyv nízkoteplotného stresu. Nízke teploty vyvolávajú v bunkách šok, ktorý indukuje tvorbu špecifických proteínov [8].

1.2.1.2 Vplyv osmotického stresu

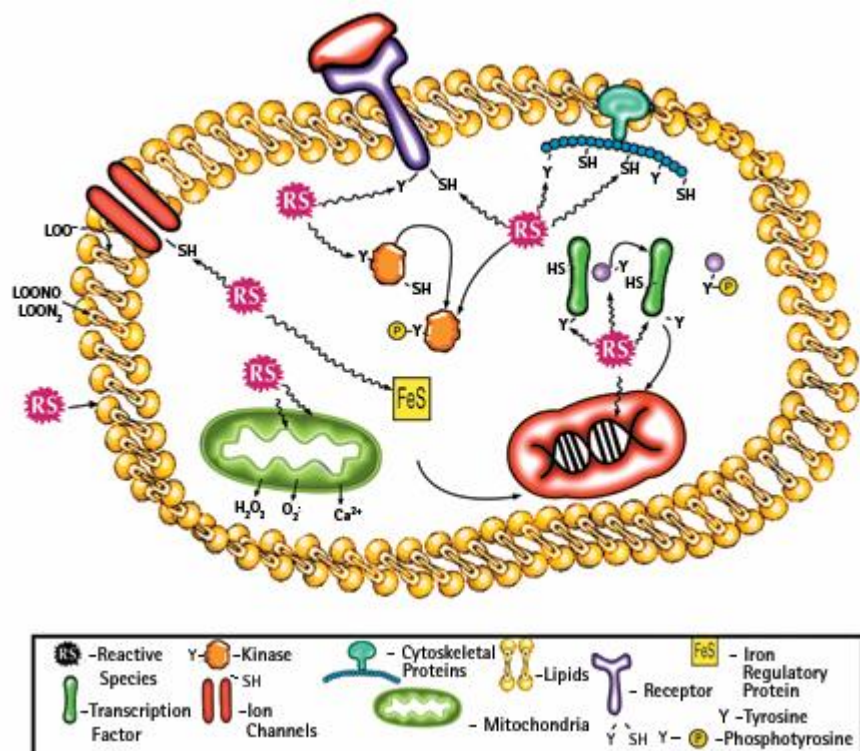
Zmeny osmotického tlaku vplyvajú v bunkách na expresiu jednotlivých génov. Zvýšená salinita prostredia vedie k produkcii stresových faktorov vyvolaných rastom intracelulárnej koncentrácie Na^+ . Adaptácia kvasinkových buniek na tieto stresové podmienky je obvykle sprevádzaná akumuláciou osmoticky aktívnych zlúčenín, ktoré slúžia k vyrovnaniu externého osmotického tlaku a premieňajú membránový transportný systém tak, aby došlo k vylúčeniu Na^+ z bunky do prostredia. Vyššia koncentrácia NaCl pôsobí ako stresový faktor, zatiaľ čo malé koncentrácie soli s iným stresovým faktorom v kultivačnom médiu možno využiť k stimulácii rastu, prípadne ku produkcii žiadúceho metabolitu [8, 15].

1.2.1.3 Vplyv chemického stresu

Bunky organizmov sú vystavené chemickému stresu z prirodzených aj priemyselných aktivít. Počas rastu na bunky vplyva jednak stres zo zlúčenín, ktoré môžu byť priamo v živnom médiu a jednak toxické metabolity, ktoré bunky samy produkujú. Rôzne chemické mutagény spôsobujú deštrukcie DNA [8].

Oxidačný stres

Oxidačný stres je spôsobovaný voľnými radikálmi a oxidantami. Pôsobenie toxického kyslíka tvorbou voľných radikálov je hlavne počas aeróbného rastu. Voľné radikály sú tvorené počas bunkového metabolizmu alebo tiež vznikajú ako sekundárne kyslíkaté reaktanty. Spôsobujú oxidatívne poškodenie proteínov, lipidov a DNA [8].

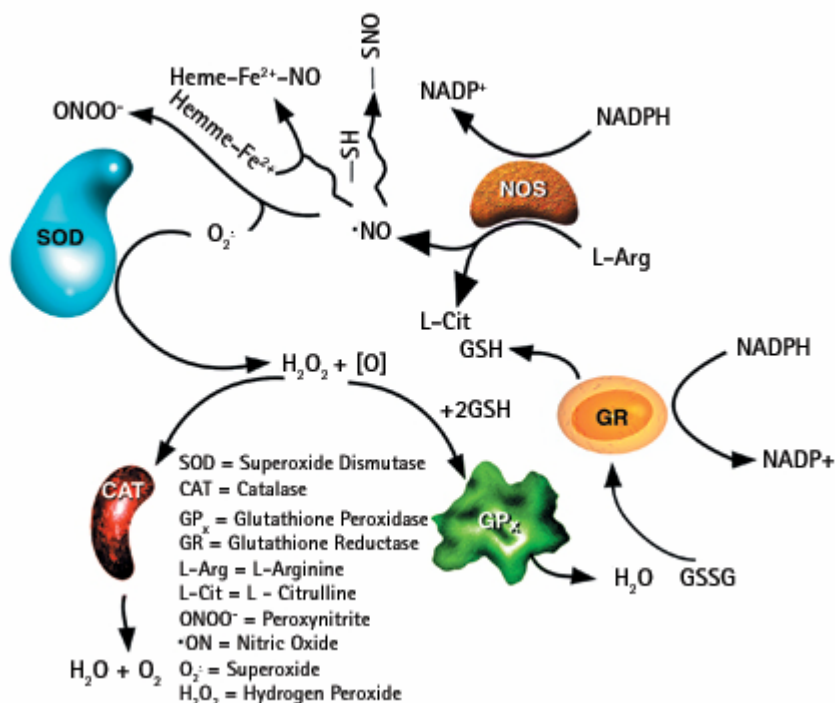


Obr. 2 Ciele reaktívnych molekúl v bunke [16]

Štruktúra proteínov a ich funkcia môže byť zmenená vplyvom reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré produkujú organizmy, alebo sú vyvolané vonkajšími stresovými faktormi. Hoci antioxidačné enzýmy prispievajú k udržiavaniu netoxickej úrovne, napriek tomu dochádza k modifikácii aminokyselinových reťazcov [17].

ROS tvorí súbor molekúl odvodených z molekulového kyslíka, zatiaľ čo voľné radikály sú molekuly s jedným alebo viacerými nespárenými elektrónmi. Hoci molekulový kyslík obsahuje dva nespárené elektróny, nie je veľmi reaktívny, pretože oba elektróny majú rovnaký spin. Keď jeden z týchto nespárených elektrónov je excitovaný a zmení spin, výsledná molekula (singletový kyslík) sa stáva účinným oxidantom. Keď je kyslík redukovaný jedným elektrónom, tvorí sa superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$, ktorý je relatívne stabilný medziprodukt. Avšak superoxidový radikál je prekursorom väčšiny vznikajúcich ROS a mediátorom v reakciách v oxidačnom reťazci. Dizmutáciou superoxidového radikálu vzniká peroxid vodíka H_2O_2 , ktorý môže byť plne redukovaný na vodu rôznymi peroxidázami. Avšak v prítomnosti redukujúcich kovov čiastočná redukcia peroxidu vodíka tvorí hydroxylový radikál $OH^{\cdot}$, jeden z najsilnejších oxidantov v prírode. Za fyziologických podmienok je hlavným zdrojom ROS v bunke únik elektrónov z mitochondriálneho elektrónového transportu [17].

Na obranu voči reaktívnym formám kyslíka obsahujú bunky antioxidačné enzýmy – superoxidodismutáza, kataláza, rôzne peroxidázy, a tiež antioxidanty – kyselina askorbová, tokoferol, či glutathion [18].



Obr. 3 Antioxidačné látky v bunke [16]

Ethanolový stres

Ethanol je hlavný produkt pri fermentácii u kvasiniek. Hromadenie ethanolu počas fermentácie je tiež forma chemického stresu. Pri raste kvasiniek zohráva ethanol funkciu inhibítora rastu za relatívne nízkych koncentrácií. Klesá aj počet buniek. Spôsobuje tiež denaturáciu intracelulárnych proteínov a glykolytických enzýmov a tiež indukuje tvorbu stresových proteínov [8].

1.2.1.4 Vplyv viacerých stresových faktorov na bunky

Na určitých druhoch kvasiniek bolo dokázané, že stresovú odozvu, ktorú vyvolávalo pôsobenie tepla, bol schopný v podobnej forme vyvolať aj iný druh stresu. Syntézu hsp proteínov indukuje vystavenie kvasinkových buniek ethanolu, vyššej koncentrácii soli, vysychaniu, ťažkým kovom, peroxidu vodíka, atď. Je samozrejmé, že stresová odpoveď na spomínané podmienky nie je identická. Tiež vystavenie kvasinkových buniek jemne zvýšeným teplotám vedie k dosiahnutiu odolnosti voči ďalším teplotným stresom. V konkrétnom prípade vystavenie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* vplyvu tepla viedlo k znateľne zvýšenej odolnosti voči ethanolovému stresu oproti kontrolným bunkám. Porovnateľný výsledok bol dosiahnutý vystavením buniek vplyvu osmotickému stresu, keď sa vystavené bunky stávajú nielen osmotolerantné ale aj odolnejšie voči teplote [14].

1.3 Karotogénne kmene kvasiniek

Karotogénnymi kvasinkami sa označujú kvasinky, ktoré sú schopné produkovať karoténové pigmenty. Tieto pigmenty spôsobujú žlté, oranžové, ružové až červené sfarbenie kolónií. Druhu patria tieto kvasinky do čeľadí *Rhodotorulaceae* a *Sporobolomycetaceae* [8]. Ich najväčší význam spočíva vo vhodnosti využitia k priemyselnej produkcii vybraných metabolitov. Na začiatku kultivácie počas množenia kvasiniek sa tvoria prevažne bezfarebné karotenoidné polyény fytoén a fytofluén. Ku koncu rastovej fázy sa začínajú tvoriť aj farebné pigmenty, najmä β -karotén, ktorý sa prejavuje oranžovou farbou. Ku koncu rastu sa v kvasinkách tvorí torulén a torularhodin, ktoré dávajú kvasinke sýto červenú farbu. V súčasnej dobe sú karotenoidy využívané ako vitamínová zložka kŕmnych zmesí a tiež ako prírodné farbivá v potravinárstve [19].

1.3.1 Čeľaď *Rhodotorulaceae*

Do čeľade *Rhodotorulaceae* patria rody *Rhodotorula*, *Rhodosporidium* a *Cystofilobasidium*. Tieto kvasinky sú rozšírené po celom svete. Dajú sa izolovať z pôdy, vzduchu, sladkej i slanej vody, z povrchov rastlín, ale aj z rôznych orgánov živočíšneho tela. Ich produkcia je nenáročná, obľubujú substráty s dostatkom cukrov, pričom sú schopné rozmnožovania aj v pôdach bez zdrojov dusíka [20].

Medzi najvýznamnejších zástupcov patria kmene *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodosporidium diabovatum* a *Cystofilobasidium capitatum*.

1.3.1.1 Rod *Rhodotorula*

Kvasinky rodu *Rhodotorula* majú malé guľaté bunky o rozmeroch (2,5 – 5,0) x (6,0 – 1,3) μm , v niektorých prípadoch sú bunky pretiahnuté až do 16 μm . Kolónie na agare sú hladké, lesklé, slizovité, riedke alebo aj cestovité. Na povrchu môžu byť niekedy zvrásnené. Okraj kolónie je ucelený, zriedkavo má občasné mycélium. Farba je korálovo červená, pomarančová až lososová, v závislosti na živnej pôde. V kvapalnom médiu sa vytvára sediment a prstenec, spravidla svetlej, krémovej až svetlo ružovej farby. Všetky druhy rodu *Rhodotorula* sú lipidotvorné, čiže dokážu v bunkách hromadiť tuky, za určitých podmienok aj v nadmernom množstve [20, 21].

Vegetatívne sa rod *Rhodotorula* rozmnožuje pučením. Pohlavné rozmnožovanie je nasledovné. Rod *Rhodotorula* je haploidné štádium v životnom cykle rodu *Rhodosporidium*. *Rhodosporidium* je teda anamorfná forma rodu *Rhodotorula*. Každá fáza životného cyklu má inú morfológiu. *Rhodotorula* má sfarbenie pigmentmi do červena až pomarančova, je tiež slizovitá, mäkká a šťavnatá, zatiaľ čo *Rhodosporidium* je drsná, suchá, hnedá až čierna. Čiernu farbu spôsobujú teliospóry, ktoré produkujú melanín [20, 22].

Kvasinky rodu *Rhodotorula* biosyntetizujú β -karotén, torulén a torularodín ako finálny produkt metabolickej dráhy karotenoidov [23]. Produkcia karotenoidov sa dá priemyselne využiť.

1.3.1.2 Rod *Cystofilobasidium*

Rod *Cystofilobasidium* patrí medzi menej popísané kvasinkové rody. Zahŕňa štyri kmene – tri ružovo sfarbené (*C. biosporidii*, *C. capitatum* a *C. infirmominiatum*) a jeden krémovo sfarbený. Kvasinky tvoria kolónie s hladkým, lesklým povrchom, tvar buniek je guľatý až pretiahnutý [22, 24].

1.3.2 Čeľaď *Sporobolomycetaceae*

Do čeľade *Sporobolomycetaceae* patria karotenoidné kvasinky tvoriace balistospóry. Patrí sem rod *Sporobolomyces* a *Sporidiobolus*. Rovnako ako u čeľade *Rhodotorulaceae* aj tu je rod *Sporidiobolus* rodom telemorfným, tj. pohlavným štádiom rodu *Sporobolomyces*. Kvasinky z týchto rodov sa často vyskytujú na lístí stromov a iných plodinách, odkiaľ sa dostávajú do tečúcich i stojatých vôd. Sú častými kontaminantmi potravín a zariadení na výrobu vína [19, 20].

Kmene patriace do čeľade *Sporobolomycetaceae* sú morfológicky aj fyziologicky variabilné. Bunky sú elipsoidné až pretiahnuté s rozmermi (2 – 12) x (3 – 35) μm . Tvorí pravé aj nepravé hýfy. Na tekutých médiách sú typické zvrásnenou kožkou. Kolónie na agare sú drsné, ploché, často s popraškom spôsobeným balistospórmi. Farba kolónií je lososovo ružová až broskyňová [20]. Najvýznamnejší zástupcovia sú kmene *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces salmonicolor*.

1.4 Enzýmy zapojené do stresovej odozvy u mikroorganizmov a rastlín

1.4.1 Antioxidačné enzýmy

Bunky majú vyvinuté enzýmové stratégie na to, ako sa brániť vplyvu reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Jedna skupina enzýmov má priamo funkciu ROS detoxifikátorov, zatiaľ čo druhá skupina pozostáva z enzýmov, ktoré slúžia ako redoxné regulátory. Obe skupiny sa svojim vplyvom prekrývajú. Jednotlivé enzymatické systémy s identickými biochemickými aktivitami môžu operovať v rôznych kompartmentoch ako napríklad v cytosole a v mitochondriách [17].

Superoxiddismutáza, kataláza a peroxidáza sú považované za obranný tím buniek, ktorého úlohou je chrániť bunky pred reaktívnymi formami kyslíka. Tieto enzýmy majú významnú úlohu v ochrane rastlinných buniek počas rastu, dozrievania aj starnutia [25].

1.4.1.1 Kataláza (CAT, EC 1.11.1.6)

Kataláza patrí medzi hémové proteíny. V prostetickej skupine obsahuje štyri ferriprotoporfyrinové zvyšky pevne viazané na bielkovinu (MW 60 000 – 65 000) [26]. Kataláza rozkladá peroxid vodíka a tiež katalyzuje oxidáciu vodíkových donorov za spotreby peroxidu. Inhibuje ju H_2S , HCN , CO , NaN_3 , niektoré kovové ióny (Cu^{2+} , Pb^{2+}), H_2O_2 ($c > 0,1 \text{ mol/l}$) a kyselina mravčia. pH optimum je v rozmedzí 6,8 – 7,5 [27]. Aktivita katalázy bola preukázaná v takmer všetkých živočíšnych bunkách a orgánoch a v aeróbných mikroorganizmoch [28].

1.4.1.2 Superoxiddismutáza (SOD, EC 1.15.1.1.)

Superoxiddismutáza je metaloproteín. Sú známe tri druhy superoxiddismutáz s odlišným obsahom kovov. Modro-zelený Cu(II)-Zn(II) enzym bol izolovaný z ľudských a hovädzích erythrocytov, vínovo-červený Mn(III) protein bol nájdený v *E. coli*, v hydine a v potkanoch a žltý Fe(III) enzym bol izolovaný tiež z *E. coli* [29, 30].

SOD katalyzuje dizmutačnú reakciu superoxidu a vodíka na menej reaktívny peroxid vodíka, ktorý je ďalej odstránený katalázami a peroxidázami. Tým pádom hrá významnú úlohu v obrane buniek voči toxickému efektu kyslíkových radikálov. Aktivita enzýmu vyžaduje redoxne aktívny ión kovu. [17, 31]. Enzým inhibuje HCN a EDTA pri pH 3,8. pH optimum je v rozmedzí 5,5 – 9,5. Molekulová hmotnosť enzýmu hovädzieho pôvodu (dimér Cu(II)-Zn(II)) je 2x 16 300 Da [32]. Enzým izolovaný z *E. coli* má molekulovú hmotnosť 2 x 22 000 Da [33]. Ľudská SOD má M_r 2 x 23-28 300 Da [34].

1.4.1.3 Peroxidáza (EC 1.11.1.7.)

Peroxidáza patrí podobne ako SOD do skupiny metaloenzýmov, čiže ich katalytická schopnosť závisí na prítomnosti iónov kovov. V prostetickej skupine obsahuje ferriprotoporfyrin, prípadne jeho deriváty (napr. zelené hemíny). Peroxidáza katalyzuje nešpecifický rozklad peroxidu vodíka za prítomnosti vhodných donorov vodíka – kyseliny askorbovej, polyfenolov a pod [35].

Vyskytuje sa najmä v rastlinných materiáloch. Peroxidázová aktivita býva spoločne s katalázovou aktivitou využívaná ako indikátor metabolickej aktivity a ukazovateľ znečistenia životného prostredia [36, 37].

1.4.2 Enzýmy ovplyvňujúce senzorické vlastnosti potravín

Vplyvom niektorých skupín enzýmov dochádza k zmenám senzorických vlastností potravín. Polyfenoloxidáza spôsobuje zmenu farby napríklad u ovocia (tzv. enzýmové hnednutie). Lipoxygenázy, lipázy a proteázy zasa spôsobujú zmeny chuti a vône potravín [38].

1.4.2.1 Polyfenoloxidáza (PPO, EC 1.14.18.1.)

Polyfenoloxidáza patrí medzi metaloenzýmy, katalytická schopnosť enzýmu závisí na prítomnosti Cu^{2+} iónov [35]. Molekulová hmotnosť je 120 000 [39]. PPO je tetramér, ktorý má dve väzbové miesta pre aromatické zlúčeniny vrátane fenolických substrátov. Tiež je jasné odlišné väzbové miesto pre kyslík [39, 40]. Enzým inhibujú zlúčeniny, ktoré sa viažu s meďou, tiež kyselina benzoová s ohľadom na katechol a kyanid s ohľadom na kyslík. Spôsobuje enzýmové hnednutie u rastlinných vzoriek. PPO je enzým, ktorý transferuje kyslík. Okrem použitia kyslíka na katalýzu dehydrogenácie katecholov na ortoquinóny a orthohydroxylácie fenolov na katecholy, bola tiež zaznamenaná aktivita peroxidázy [39].

1.4.2.2 Lipoxygenáza (LOX, EC 1.13.11.12.)

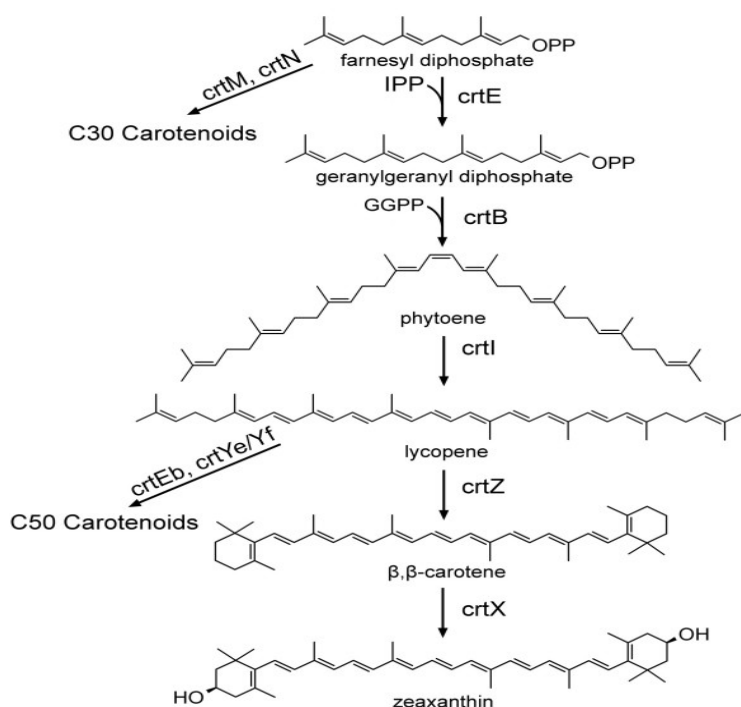
Lipoxygenáza je dioxigenáza, ktorá katalyzuje oxidáciu nenasýtených mastných kyselín obsahujúcich cis-1,4-pentadiénovú skupinu molekulovým kyslíkom. Vznikajúce peroxidy mastných kyselín sa ďalej štiepia na karbonylové zlúčeniny alebo mastné kyseliny s krátkymi reťazcami. Ako substrát najčastejšie slúžia kyseliny linolová, linolenová a arachidonová [35, 41].

Za najbohatší zdroj lipoxygenázy sa považuje sója, z ktorej sa dajú izolovať 4 izoméry – lipoxygenáza 1, -2, 3a a 3b (LOX-1, LOX-2, LOX-3a a LOX-3b). LOX-3a a LOX-3b vykazujú veľmi podobné vlastnosti, a tak sa zvyknú označovať len ako LOX-3. Za vhodných podmienok vykazuje LOX-1 ideálny kinetický model, pričom tvorí peroxidy kyseliny linoleovej a konjugované diény a viaže kyslík v presnej stechiometrii. Okrem toho je reakčný stupeň priamo proporcionálny množstvu enzýmu. V porovnaní s LOX-1 je kinetika LOX-3 komplikovanejšia a to najmä tým, že primárny peroxidový produkt je čiastočne transformovaný na ketodién, ktorý neabsorbuje pri 234 nm ako LOX-1, ale má maximum pri 280 nm. LOX-2 síce absorbuje pri 234 nm, ale ako jej substrát slúži prevažne kyselina arachidonová. Všetky štyri izoenzýmy majú formu globulárneho proteínu o molekulovej hmotnosti $100\,000 \pm 5\,000$. Každý izoenzým obsahuje jeden kovalentne viazaný atóm železa na molekulu. Na pH optimum vplyvajú rôzne faktory (koncentrácia substrátu, pôvod substrátu, iónová sila, teplota, prítomnosť detergentu, atď.). pH optimum sa tým pádom líši u každého izoenzýmu. LOX-1 má pH optimum v rozmedzí pH 9,0 – 9,5, LOX-2 a LOX-3 v rozmedzí pH 6 – 7 [41].

1.5 Neenzýmové antioxidačné látky

1.5.1 Karotenoidy

Karotenoidy sú žlté a oranžové, výnimočne tiež žltozelené a červené, prevažne lipofilné farbivá. Vyskytujú sa v ovocí (mango, pomaranč, papája), zelenine (paradajky, mrkva), fotosyntetizujúcich rastlinách, hubách, riasach, mikroorganizmoch (*Phaffia rhodozyma*, *Rhodotorula glutinis*, *Erwinia carotowora*) a tiež živočíchoch. Hoci existuje veľa prírodných zdrojov karotenoidov, v posledných rokoch je zvýšený dopyt po mikrobiálnej produkcii karotenoidov. Karotenoidy patria medzi terpénoidy, obsahujú osem izoprénových jednotiek. Farebnosť spôsobujú reťazce konjugovaných dvojitéch väzieb. Karotenoidy sa delia na dve hlavné skupiny – karotény a xantofily. Najjednoduchším prekursorom karoténov je acyklický polynásýtený uhlíkovodík lykopén. Ďalšie karotény vznikajú enzýmovou katalyzovanou cyklizáciou z acyklických ψ -karoténov, pričom sa tvoria α - alebo β -iónonové štruktúry. Štruktúra s β -iónonovým cyklom sa nazýva β -karotén [42-44].



Obr. 4 Metabolická dráha karotenoidov [45]

Hlavný účinok karotenoidných pigmentov spočíva v ich antioxidačnom efekte. Poskytujú fotooxidatívnu ochranu pred účinkami voľných radikálov vznikajúcich účinkom svetla a tiež chránia pred účinkami reaktívnych foriem kyslíka [44, 46].

Karotenoidy sa rýchlo chemicky denaturujú vystavením vplyvu svetla, tepla a kyslíka. β-karotén rapídne degraduje po vystavení aj UV aj VIS žiareniu [47].

1.5.2 Polyfenoly

Prirodzenou súčasťou rastlín sú štruktúrne rôznorodé fenolové zlúčeniny. Najbežnejšími z nich sú flavonoidy, fenolové kyseliny a ligniny. Tieto látky chránia lipoproteíny s nízkou hustotou pred oxidačnými modifikáciami, znižujú riziko infarktu myokardu znižovaním tvorby krvných zrazenín a tiež majú pravdepodobne antikarcinogénny účinok [48, 49].

Na celkovom príjme polyfenolov sa podieľajú z cca dvoch tretín flavonoidy. Medzi základné štruktúry flavonoidov patria katechíny, leukoanthokyanidíny, flavanóny, flavonoly, anthokyanidíny, chalkóny, dihydrochalkóny, auróny a izoflavonoidy. Aj tieto látky majú široké uplatnenie v antioxidačnom systéme. Zlepšujú vstrebávanie minerálov a vitamínov, sú antikarcinogénne, znižujú tvorbu oxidovaných lipoproteínov a lipidov, ničia voľné radikály a tiež môžu viazať a inaktivovať niektoré prooxidačné kovové ióny [50, 51].

1.6 Metódy izolácie proteínov z biologických materiálov

Dezintegrácia bunky predstavuje nevratnú deštrukciu jej anatomickej entity. Z experimentálneho hľadiska je daný stav dosiahnuteľný porušením bunkovej steny za použitia rôznych faktorov – fyzikálnych, chemických, enzymatických a biologických. Vo väčšine

prípadoch je po dezintegrácii potrebná izolácia morfológicky a funkčne intaktných subcelulárnych štruktúr [52].

1.6.1 Proteíny – ich štruktúra a stabilita

Funkcia proteínov v organizmoch je rôzna. Ako enzýmy katalyzujú procesy v bunke, ako transportné proteíny zabezpečujú presun kyslíka v bunkách, zabezpečujú pohyb (hlavná súčasť svalov), sú potrebné pre mechanický transport (kolagén a iné vláknité proteíny v koži, kĺboch a kostiach), sprostredkujú odozvu buniek na podnety, tvoria imunitný systém, atď.

Na základe biosyntézy sa proteíny vinú do prirodzenej konformácie, ktorá je štruktúrne stabilná a funkčne aktívna. Získaná konformácia proteínov závisí na poradí aminokyselín v polypeptidovom reťazci, čo vysvetľuje prečo rôzne polypeptidy majú rôzne typy konformácie [53].

Tieto konformácie tvoria sekundárnu štruktúru proteínu. Všeobecne sa proteíny vinú do dvoch hlavných foriem – globulárne a fibrilárne. Sekundárnu štruktúru pre globulárne proteíny tvorí α -helix, pre fibrilárne β -skladaný list. Terciárna štruktúra tvorí 3D štruktúru polypeptidových jednotiek daného proteínu. Je stabilizovaná nekovalentnými interakciami medzi aminokyselinovými zvyškami – vodíkovými väzbami, hydrofóbnymi interakciami, elektrostatickými silami a van der Waalsovými silami. Z hľadiska prirodzenej stability proteínu sú najdôležitejšie hydrofóbne interakcie. Tzv. hydrofóbny efekt sa pripisuje tendencii nepolárnych látok minimalizovať kontakt s polárnym rozpúšťadlom typu voda. Nepolárne zvyšky aminokyselín tvoria významnú mieru primárnej sekvencie polypeptidov. Tieto polypeptidy sa zvinú tak, aby nová konformácia bola maximálne energeticky výhodná.

Mnoho proteínov obsahuje dva a viac polypeptidových reťazcov, ktoré držia pokope pomocou nekovalentných väzieb, ktoré stabilizujú terciárnu štruktúru. Proteíny s viacnásobným polypeptidovým reťazcom sa nazývajú oligoméry. Štruktúra tvorená monomér-monomér interakciou v oligomére sa nazýva kvartérna štruktúra [53].

Stabilita proteínov je krehká vďaka jemnej rovnováhe medzi stabilizujúcimi a destabilizujúcimi interakciami. Termín „stabilita proteínu“ udáva zachovanie jedinečnej chemickej a 3D štruktúry polypeptidového reťazca aj počas výkyvov z fyziologických podmienok. Denaturácia a stabilita sú vzájomne prepojené cez prelomenie natívnej štruktúry proteínu, ktorá je jedinou možnosťou kvantifikovania stability proteínu [54].

1.6.2 Prehľad možných metód dezintegrácie buniek

Pri izolácii bielkovín z biologických materiálov je dôležité brať do úvahy materiál, z ktorého má byť daný proteín vyizolovaný a to najmä z hľadiska koncentrácie proteínu v zdroji, jeho dostupnosti a ceny, či z hľadiska problémov pri manipulácii s daným materiálom. Izolácia bielkoviny je často kompromisom medzi zachovaním bielkoviny a jej čistotou. Dôležitú úlohu zohráva nájdenie vhodnej metódy, pomocou ktorej sa získa vyizolovaná nedegradovaná a nadenaturovaná bielkovina v čo najväčšom množstve [55].

Tab. 2 Prehľad dezintegračných metód [52]

Fyzikálne		Chemické	Enzymatické	Biologické
Mechanické	Nemechanické			
• balistické • extruzívne • ultrazvuk • nízky tlak • kombinované metódy	• osmotický šok • teplotný šok • šok chladom • zamrzanie a rozmrzanie • dehydratácia • pomalé zníženie tlaku • fázové zmeny za vysokého tlaku	vplyv: • bázy • kyseliny • soli • detergentov • antibiotík • inhibítorov • organických rozpúšťadiel	vplyv: • lytických enzýmov z baktérií, kvasiniek, húb • imobilizovaných lytických enzýmov	vplyv: • fágov • baktericídov • intracelulárnych parazitov • plazmidov • autolýzy

Tab. 3: Prehľad bežných dezintegračných metód aj s podmienkami izolácie a vhodným typom biologického materiálu [56]

Extrakčný proces	Typické podmienky	Zdroj proteínu	Komentár
Jemný			
lýza buniek (osmotický šok)	2 objemy vody do 1 objemu buniek	erytrocyty <i>E.coli</i> v periplazme: intracelulárne proteíny	nízka výťažnosť produktu ale nižšie uvoľnenie proteáz
enzymatické štiepenie	lyzozým 0,2 mg/ml, 37°C, 15 min.	mikroorganizmy: intracelulárne proteíny	len laboratórne objemy, zvyčajne v kombinácii s mechanickou dezintegráciou
ručná homogenizácia	-	pečeň	
drvenie (mletie)	-	svaly	
Mierny			
čepeľový homogenizátor	podľa návodu k prístroju	svalové tkanivo, väčšina živočíšnych tkanív, rastlinné tkanivá	
obrusovanie s abrazívnym materiálom (piesok)	-	mikroorganizmy, rastlinné tkanivá	
Silný			
ultrazvuk alebo mletie pomocou guľôčok	podľa návodu	suspenzia buniek: intracelulárne proteíny v cytoplazme, periplazme	malé objemy
Manton-Gaulinov homogenizátor	podľa návodu k prístroju	suspenzia buniek	len veľké objemy

french press	podľa návodu k prístroju	mikroorganizmy, rastlinné tkanivá	
frakcionálne zrážanie	-	extracelulárne: vylúčené rekombinanty, lyzáty buniek	precipitáty musia byť znova rozpustené

Prvým krokom v izolácii proteínov je ich prevedenie do roztoku. Homogenizácia experimentálneho materiálu je nevyhnutná v prípade izolácie biomakromolekúl z rastlinných a živočíšnych zdrojov. K homogenizácii materiálu dochádza hlavne mechanickým spôsobom za použitia mixovania, krájania, mletia či trenia v trecej miske. Biologický materiál je prevedený do vhodného prostredia. U mikroorganizmov dochádza k odseparovaniu buniek od kultivačného média, a to odstredovaním alebo filtráciou [55].

Dezintegračné metódy sa delia na fyzikálne (drvenie a mletie buniek, ultrazvuk, zahrievanie, striedanie teplôt), chemické (kyslé a zásadité prostredie, povrchovo aktívne látky, organické rozpúšťadlá, aminokyseliny, antibiotiká), enzýmové (lytické enzýmy, autolýza) a biologické (autolýza, baktericídy). Účinok dezintegračného procesu závisí na druhu dezintegrovaného materiálu, na podmienkach kultivácie mikrobiálnych buniek, na fáze rastu, na pH, na teplote, na iónovej sile suspendujúceho prostredia a tiež na dobe dezintegrácie [52, 57].

Typ extrakcie na získanie proteínov by mal byť vybraný na základe daného biologického materiálu. Je rozdiel, či sa jedná o baktérie, rastliny, alebo živočíšne tkanivá, či sú to proteíny intracelulárne alebo extracelulárne. Použitá metóda by mala byť čo najcitlivejšia, pretože rozbitím bunky dochádza k uvoľneniu proteolytických enzýmov a všeobecne ku acidifikácii. Extrakcia by mala byť prevedená rýchlo, za miernej teploty, v prítomnosti vhodného pufru na udržanie vhodného pH a iónovej sily na udržanie stability vzorky [56].

1.6.2.1 Mechanická dezintegrácia

Mechanickou dezintegráciou sa myslí fyzické porušenie bunkového obalu a uvoľnenie všetkých intracelulárnych komponentov do okolitého média. Mechanická dezintegrácia môže byť prevedená pomocou:

Homogenizátora. Homogenizátor pumpuje zmes materiálu cez vyhradený otvor za použitia vysokého tlaku (1500 barov). Nasleduje expanzia cez špeciálnu vystupujúcu trysku. Metóda je použiteľná hlavne na získanie intracelulárnych molekúl.

Guličkového mlyna. Guličkový mlyn je zariadenie, v ktorom dochádza k dezintegrácii miešaním buniek v suspenzii s malými abrazívnymi časticami. Bunky praskajú, pretože pôsobia strižné sily a obrusovanie medzi guľôčkami a kolízie s guľôčkami. Je tiež možné použitie guľôčok na dezintegráciu bez mlyna, len s použitím vortexu.

Ultrazvuku. Ultrazvuk pôsobí na bunky v suspenzii nepočuteľným zvukom (väčším než 18 kHz). Výsledkom je inaktivácia buniek a ich dezintegrácia.

French press. Strižné sily narušujú bunkovú stenu, keďže bunky sú tlačené malým otvorom vysokým tlakom.

Centrifugácie. V prípade slabých bunkových stien [58].

Nevýhodou mechanickej dezintegrácie je kompletne rozbitie bunky a vyplavenie celého obsahu bunky. Preto objekt záujmu, tj proteíny, musia byť separované od ostatných častí bunky (nukleové kyseliny, fragmenty bunkových stien, atď.). Zvyšky bunky po mechanickej dezintegrácii totiž sťažujú prečistenie roztoku. Môže sa použiť viacnásobná centrifugácia alebo mikrofiltrácia, ale je potrebné si uvedomiť, akú látku chceme získať. Práve u proteínov je potrebné dať pozor na teplotu, ktorá môže byť pri mechanickej dezintegrácii vyššia, aby nedochádzalo k denaturácii [58].

1.6.2.2 *Nemechanické metódy dezintegrácie*

Ďalšou z možností dezintegrácie buniek je využitie ich permeabilizačnej schopnosti. Toto môže byť dosiahnuté nasledovnými metódami:

Chemická permeabilizácia. Bolo vyvinuté veľké množstvo chemických metód za cieľom extrahovania intracelulárnych komponent z bunky permeabilizovaním vonkajšej membrány. Permeabilizácia býva dosiahnutá použitím organických rozpúšťadiel (toluén, éter, DMSO, benzén, methanol, chloroform), ktoré tvoria kanáliky skrz bunkovú membránu. Chemická permeabilizácia sa dá tiež dosiahnuť pomocou antibiotík, thionínov, povrchovo aktívnych látok, chaotropných činidiel, či chelátov.

Mechanická permeabilizácia. Jednou z metód je osmotický šok. Zatiaľ čo bunky vystavené pomalejšiemu vonkajšiemu osmotickému tlaku sú schopné sa adaptovať daným zmenám, bunky vystavené prudkej zmene osmotického tlaku sú mechanicky zraniteľné. Typickým osmotickým aktívnym činidlom je roztok sacharózy. Najprv bunky vyrovnajú vnútorný tlak v bunke s externým tlakom v médiu, potom dôjde k rapidnému zriedeniu roztoku sacharózy. Výsledkom je pretlak v cytozóle, ktorý spôsobí deštrukciu bunkovej membrány. Enzýmy získané touto metódou sa považujú za periplazmatické alebo za enzýmy lokalizované neďaleko povrchu bunky.

Enzymatická permeabilizácia. Enzýmy môžu byť tiež použité k permeabilizácii buniek, ale táto metóda je často limitovaná objavením sa periplazmatických alebo povrchových enzýmov. Najčastejšie používanými enzýmami sú glykanázy, proteázy a manázy.

Ďalšie permeabilizačné techniky. Bázické proteíny ako napríklad prolamin alebo kationový polysacharid chitosan sú schopné permeabilizácie kvasinkových buniek [58].

1.6.3 *Dôležité faktory pri izolácii bielkovín*

pH a pufry. Hodnota pH pre izoláciu je obvykle v maxime aktivity proteínu. Avšak nie vždy je pri tomto pH najúčinnější izolácia. Dôležitá je taká hodnota pH, ktorá zaručuje maximálnu stabilitu proteínu. Väčšina proteínov je maximálne rozpustná v pufrach miernej iónovej sily, tj. 0,05 – 0,1M [55].

Detergenty. V mnohých prípadoch je žiadaný proteín viazaný v membránach alebo v zhlukoch v dôsledku hydrofóbného charakteru. Tieto interakcie sú redukované použitím detergentov. Neiónogénne detergenty sa najčastejšie používajú na extrakciu membránových proteínov. Detergent by mal byť použitý za koncentrácií blízko alebo nad kritickou micelárnou

koncentráciou, to znamená koncentráciou, pri ktorej monoméry detergentu začínajú asociovať navzájom. Táto koncentrácia závisí na type detergentu a na experimentálnych podmienkach [55, 56].

Tab. 4 Príklady používaných detergentov [55]

Dodecylsulfát sodný	0,1 – 0,5%	Denaturuje proteíny, používaný na PAGE-SDS
Triton-X-100	0,1%	Neionogénny detergent pre solubilizáciu membrán (upozornenie: Môže silno absorbovať pri 280 nm)
Nonidet-P-40	0,05 – 2%	-
Dodecyl β D maltozid	1%	-
Oktyl β D glukozid	1 – 1,5%	-

Redukčné činidlá. Redoxný potenciál cytosolu je nižší než redoxný potenciál okolného média, kde je prítomný atmosférický kyslík. Intracelulárne proteíny majú často voľné thiolové skupiny, ktoré môžu byť oxidované v purifikačnom procese. Tieto skupiny môžu byť chránené pomocou redukčných činidiel ako napr. DTE, DTT alebo merkaptoethanol.

Cheláty a ióny kovov. Prítomnosť ťažkých kovov môže byť škodlivá pre biologickú aktivitu proteínu. Preto sa využívajú chaletačné činidlá. Najbežnejším je EDTA. Tiež sa využívajú vápenaté a horečnaté ióny, avšak nesmú byť používané súčasne s EDTA.

Proteolytické inhibítory. Najväčším nebezpečenstvom pre stabilitu proteínov sú proteázy. Najjednoduchšia ochrana je rýchla práca za studena. Ďalšou možnosťou je prídanie proteolytických inhibítorov (DFP, EDTA, Pepstatin A).

Bakteriostatiká. Hlavnou úlohou je zastavenie bakteriálneho rastu v roztokoch proteínov. Často sa používa azid sodný alebo n-butanol [55].

Tab. 5 Bežne používané látky pri príprave vzorky [55]

Používané látky	Typické podmienky použitia	Účel
Súčasť pufrov		
Tris	20 mM, pH 7,4	udržiava pH, minimalizuje acidifikáciu spôsobenú dezintegráciou lyzozómov
NaCl	100 mM	udržiava iónovú silu média
EDTA	10 mM	redukuje vplyv oxidácie, chelatuje kovové ióny
sacharóza a glukóza	25 mM	stabilizuje lyzozomálne membrány, redukuje uvoľňovanie proteáz
detergenty – iónogénne a neiónogénne	Vid' tab. 4	extrakcia a purifikácia membránových proteínov, rozpustenie slabo rozpustných proteínov
DNAza a RNAza	1 µg/ml	degradácia nukleových kyselín, redukuje viskozitu vzorky

<i>Inhibitory proteáz</i>		
PMSF	0,5 – 1 mM	inhibuje serínové proteázy
APMSF	0,4 – 4 mM	inhibuje serínové proteázy
benzamidín-HCl	0,2 mM	inhibuje serínové proteázy
pepstatin	1 µM	inhibuje asparágové proteázy
leupeptin	10 - 100 µM	inhibuje cysteínové a serínové proteázy
chymostatin	10 - 100 µM	inhibuje chymotrypsínové, papaínové a cysteínové proteázy
antipain-HCl	1 - 100 µM	inhibuje papaínové, cysteínové a serínové proteázy
EDTA	2 - 10 mM	inhibuje metaloproteázy, zinok a železo
EGTA	2 - 10 mM	inhibuje metaloproteázy, vápnik
<i>Redukujúce činidlá</i>		
DTT 1,4-dithiothreitol	1 - 10 mM	udržiava reziduá cysteínu redukované
DTE 1,4-dithioerythritol	1 - 10 mM	-
merkaptioethanol	0,05%	-
<i>Ostatné</i>		
glycerol	5 – 10%	pre stabilizáciu

1.6.4 Purifikácia proteínov po vyzolovaní

Purifikácia proteínov má rozsah od jednoduchej jednokrokovej zrážacej reakcie až po purifikačné procesy vo veľkom merítke. Často je potrebný viac než jeden purifikačný krok na to, aby bola dosiahnutá požadovaná čistota. Kľúčom k úspešnej a účinnej purifikácii je výber najvhodnejšej techniky, jej optimalizácia a kombinácia všetkých faktorov tak, aby cieľom bol minimálny počet purifikačných krokov. Väčšina purifikačných schém zahŕňa určitú formu chromatografie. Dostupnosť rôznych chromatografických techník s rôznou selektivitou umožňuje purifikáciu akejkoľvek biomolekuly. Je ale dôležité si uvedomiť, že každý purifikačný krok spôsobuje určitú stratu produktu. Proteín by si mal tiež zachovať svoju biologickú aktivitu [56, 59].

Purifikácia sa dá rozdeliť do troch častí. Cieľom prvej časti je izolovať, koncentrovať a stabilizovať cieľový produkt. Druhá časť sa zaoberá odňatím väčšiny hlavných nečistôt typu nukleové kyseliny, sacharidy, lipidy a pod. Tretia časť má za cieľ dosiahnutie vysokej čistoty odstránením stopových množstiev nečistôt [56].

Na prečistenie vzorky sa používajú nasledovné metódy:

Centrifugácia. Používa sa pred prvým chromatografickým krokom. Odstraňuje lipidy a jemné pevné častice.

Ultrafiltrácia. Používa sa pred prvým chromatografickým krokom. Odstraňuje soli a koncentruje vzorku.

Frakcionálne zrážanie. Čiastočne prečisťuje vzorku, môže ju tiež koncentrovať. Používa sa pred prvým chromatografickým krokom. Zrážacie techniky sú často ovplyvnené teplotou, pH a koncentráciou vzorky [56].

Tab. 6 Príklady zrážacích techník [55]

Zrážacie činidlo	Typické podmienky použitia	Typ vzorky	Komentár
síran amónny	nasýtený roztok síranu amónneho	> 1 mg/ml proteínov, špeciálne imunoglobulíny	stabilizuje proteíny, nenedenaturuje
dextran síran	pridať 10% dextranu, miešanie, centrifugácia	vzorky s vysokým obsahom lipoproteínov	vyzráža lipoproteíny
polyvinylpyrolidín	pridať 3% (w/v), miešať 4 hod, centrifugácia, vyhodit' zrazeninu	rovnaké ako u dextran sulfátu	alternatíva k dextran sulfátu
polyetylén glykol (PEG, $M_r > 4000$)	do 20% wt/vol	plazmové proteíny	nedenaturuje
acetón	do 80% vol/vol za 0°C	vyzrážanie alebo koncentrácia vzoriek pred elektroforézou	môže zdenaturovať proteín nevratne
polyetylénimín	0,1% w/v		zráža nukleoproteíny
protamín sulfát	1%		zráža nukleoproteíny
streptomycín sulfát	1%		vyzrážanie nukleových kyselín

Jednotlivé purifikačné kroky sú založené na využití fyzikálnych a chemických vlastností biomakromolekúl. Rozhodujúcim faktorom v prípade proteínov je primárna štruktúra. Poradie aminokyselín v reťazci totiž určuje funkciu a vlastnosti proteínu. Sekundárna a terciárna štruktúra sú zodpovedné za biologickú aktivitu proteínu. Metódy, ktoré sa používajú na purifikáciu sú uvedené v Tab. 7 [56, 57, 59].

Tab. 7 Purifikačné metódy [52]

Separácia na základe veľkosti	Separácia na základe náboja	Separácia na základe hydrofóbnosti	Separácia na základe biologickej aktivity	Separácia na základe izoelektrického bodu
SDS-elektroforéza	elektroforéza	hydrofóbne interakcie	bioafinitná chromatografia	izoelektrická fokusácia
gradientová elektroforéza				

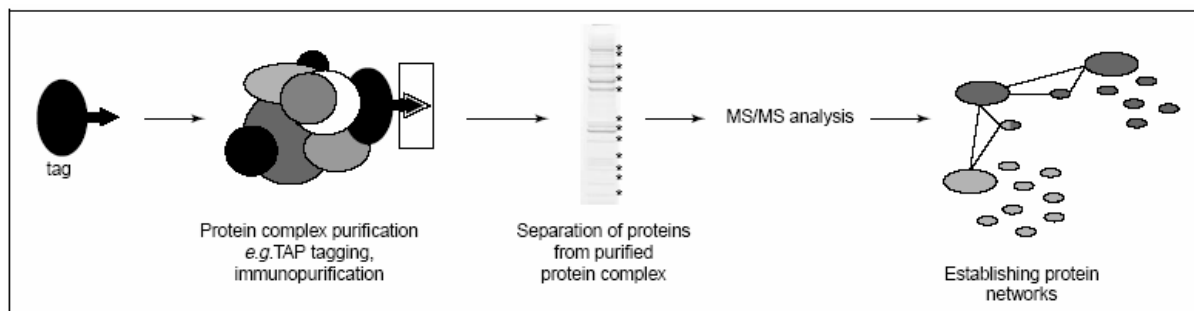
Po purifikácii je preparát zakoncentrovaný pomocou ultrafiltrácie, mrazovej sublimácie či kryštalizácie. Overenie stupňa čistoty vyizolovanej látky sa najčastejšie prevádza pomocou elektroforetických a chromatografických metód [57].

1.6.5 Tandemová afinitná purifikácia ako účinný nástroj v purifikácii proteínov

Analýza proteómu, najmä pomocou hmotnostnej spektrometrie, si vyžaduje rýchlu a spoľahlivú metódu purifikácie proteínov. Vhodnou metódou je afinitná purifikácia založená na fúzii značky, tzv. „tagu“, ktorým je zvyčajne peptid alebo malý proteín, do cieľového proteínu [60].

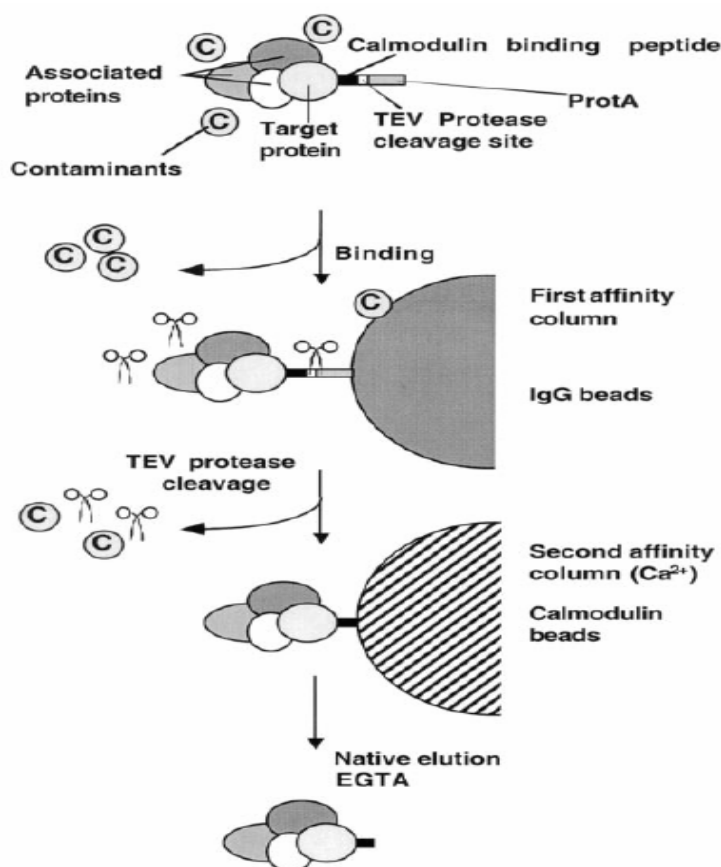
Väčšina bunkových procesov je prevádzaná multiproteínovými komplexmi. Identifikácia a analýza ich súčastí poskytuje pohľad na to, ako je proteóm organizovaný ako celok [61]. Biochemická purifikácia proteínov v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou dovoľuje detekovať proteíny už o množstve 100 fmol, čo umožňuje rýchlu charakterizáciu akéhokoľvek proteínu v komplexnej zmesi, samozrejme za predpokladu, že žiadaný proteín je v dostatočnom množstve dostatočne purifikovaný. Kompletne zmapovaný genóm niektorých organizmov umožňuje rýchlejšiu identifikáciu pomocou MS. Limitujúcim prvkom sa preto stáva purifikácia proteínu, nie jeho identifikácia. Každý proteín má však svoje špecifické vlastnosti, ktoré sa dajú využiť pre purifikáciu. Preto je takmer nemožné navrhnúť všeobecnú metódu purifikácie proteínov [62].

TAP metóda skúma interakcie proteín – proteín. Metóda zahŕňa vnesenie TAP značky, tzv. „TAP tag“ do cieľového proteínu a následne vnesenie tohto konštruktu do hostiteľského organizmu. Pre dosiahnutie optimálnych výsledkov je dôležité udržať podmienky exprese fúzovaného proteínu čo najbližšie prirodzenému výskytu. Inak dochádza k zvýšenej expresii proteínov indukovaných ich asociáciou s neprirodzenými partnermi (napr. „heat shock“ proteíny). Po kultivácii a príprave bunkového extraktu je vnesený proteín aj s reagujúcimi partnermi regenerovaný dvoma špecifickými afinitno-purifikačnými a elučnými krokmi. Následne je prevedená gélová elektroforéza a MS analýza [62].



Obr. 5 Všeobecná schéma analýzy proteínu s použitím tandemovej afinitnej purifikácie [63]

TAP tag pozostáva z dvoch IgG viazajúcich domén: proteín A (ProtA) zo *Staphylococcus aureus* a kalmodulín viazajúci peptid s miestom, ktoré je možné štiepiť TEV proteázou. Obe domény sa vyznačujú silnou schopnosťou regenerácie viazaných proteínov aj pri nízkych koncentráciách. ProtA sa viaže pevne k IgG matrici vyžadujúc použitie TEV proteázy k uvoľneniu materiálu. Eluát tohto prvého afinitného kroku je následne inkubovaný v prítomnosti kalmodulínom potiahnutých guľčiek za prítomnosti vápnika. Materiál sa naviaže. Po premytí, ktoré odstráni kontaminanty a zvyšky TEV proteázy z prvého kroku je viazaný materiál uvoľnený pomocou EGTA. Následne je proteín analyzovaný [62].



Obr. 6 TAP purifikácia krok po kroku [62]

Materiál získaný TAP metódou môže byť analyzovaný rôznymi smermi. Hlavnou aplikáciou TAP metódy je identifikácia proteínu, ktorý interaguje s cieľovým proteínom. Ďalšou aplikáciou je analýza štruktúry alebo aktivity purifikovaného komplexu. TAP technika môže byť tiež použitá na purifikáciu rekombinantných proteínov [62].

1.7 Metódy analýzy proteínov vo vzorkách

1.7.1 Stanovenie celkového obsahu proteínov vo vzorke

Výber vhodnej metódy pre stanovenie celkového obsahu proteínov vo vzorke závisí na povahe vzorky, prístrojovom vybavení, dostupných chemikáliách, či požadovanej citlivosti a presnosti. Stanovenie je prevedené spektrofotometricky. Väčšina bežne používaných metód je kolorimetrických (Lowryho, Biuretova, Bradfordova, Smithova), je však možné stanoviť proteíny aj z UV spektra. Je dobré pracovať v lineárnom rozsahu metódy, keď absorbancia je priamo úmerná koncentrácii [64].

1.7.1.1 Biuretová metóda

Princíp metódy je založený na reakcii peptidovej väzby s Cu (II) v alkalickom prostredí. Tvorí sa modrofialové sfarbenie s maximom absorbancie pri 540 nm. Je nutné použiť štandard, najčastejšie hovädzí albumín. Nevýhodou metódy je malá citlivosť (1 – 10 mg). Interferujú NH_4^+ ióny [64].

1.7.1.2 Lowryho metóda

Pôvodne metóda vzniknutá v roku 1951 bola v roku 1972 modifikovaná. Nízka citlivosť Biuretovej metódy bola zvýšená použitím Folin-Ciocalteauho činidla. Dochádza k redukcii fosfomolybdenanov a fosfowolframanov tyrozínom, tryptofánom a cysteínom. Meria sa absorbanca pri 650 nm. Aj v tomto prípade je nutné použitie štandardu, najčastejšie hovädzieho albumínu. Metóda je citlivejšia (2 – 100 μg) než Biuretova, sfarbenie však nie je v čase stabilné. Interferujú NH_4^+ ióny a silné kyseliny [64].

1.7.1.3 Bradfordova metóda

Princíp metódy spočíva v naviazaní farbiva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteínu. Po väzbe farbiva na proteín dochádza k farebnej zmene, ktorá je úmerná množstvu proteínu. Hnedá farba sa po reakcii s proteínom mení na intenzívne modrú, $\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$. Metóda je populárna, pretože je rýchla (5 min) a citlivá (1 – 20 μg). Problémom je interferencia detergentov. Je nutné použitie štandardu [64, 65].

Všetky spomínané metódy sú deštruktívne, vzorka je pre ďalšiu analýzu nepoužiteľná [64].

1.7.1.4 Stanovenie z UV spektra

Proteíny, ktorých vedľajšie reťazce obsahujú tyrozín a tryptofán, absorbujú svetlo v UV oblasti spektra pri 275 až 280 nm. Citlivosť metódy je od 20 μg do 3 mg, avšak presnosť je len uspokojivá. Hlavnými interferujúcimi látkami sú detergenty, nukleové kyseliny a tukové čiastočky. Je možné merať absorbanciu aj pri 205 nm. Táto metóda je citlivejšia (1 – 100 μg), avšak presnosť aj interferujúce látky sú rovnaké [64].

Existujú aj iné metódy stanovenia proteínov (Bicinchoninová, Ninhydrínová), ale nie sú natoľko používané.

1.7.2 Metódy pre identifikáciu proteínov

Existujú viaceré metódy, ktoré sa používajú na identifikáciu proteínov. Základom je 2D elektroforéza, ktorej cieľom je proteíny separovať. Analýzy proteómu pomocou 2D elektroforézy umožňuje získať rýchly prehľad zmien, ktoré nastávajú v bunke. Identifikácia odseparovaných proteínov prebieha pomocou hmotnostnej spektrometrie [4]. Teoretické princípy elektroforetických metód sú bližšie popísané v kap. 1.8, hmotnostná spektrometria je popísaná v kap. 1.10.

1.7.3 Enzýmová analýza

Základným komponentom všetkých známych enzýmov je proteín. Enzýmy sú v prírode takmer vždy súčasťou bunky, len málokedy ich je možné nájsť samostatne. Niektoré enzýmy úplne strácajú svoju aktivitu, ak sú izolované zo svojho prirodzeného prostredia. Z toho vyplývajú ťažšie podmienky stanovenia enzýmov [66].

V praxi, pri fotometrických stanoveniach enzýmových aktivít, sa obvykle merajú zmeny koncentrácie v čase, tj. reakčná rýchlosť. Tá je závislá na koncentráciách substrátov, množstve enzýmu, fyzikálno-chemických vlastnostiach prostredia, či prítomnosti modifikátorov. Je dôležité mať zistené všetky faktory pred začiatkom analýzy. V najjednoduchšom kinetickom modeli je premieňaný jediný substrát za vzniku jediného produktu. Takých reakcií je však málo, najčastejšia forma enzýmových reakcií je dvojsubstrátová, tj. enzým katalyzuje premenu dvoch substrátov obvykle za vzniku dvoch produktov. Ak má byť výsledok vyjadrený ako rýchlosť premeny substrátu, musí sa zmeraná hodnota vzťahovať na celkový objem. Rýchlosť premeny substrátu sa vyjadruje jednotkou katal (kat), ktorá vyjadruje premenu molu substrátu za 1 s (mol/s). Najčastejšie býva enzýmová aktivita stanovená spektrofotometricky, avšak existujú aj iné metódy, pričom dôraz sa kladie na minimalizáciu procesov [67].

1.8 Elektroforetické separačné metódy

Elektromigračné alebo tiež elektroforetické metódy sú súbory techník, ktoré využívajú pohyb ionizovaných častíc v elektrickom poli. Každá častica migruje odlišnou rýchlosťou a tvorí oddelené zóny. Každá takáto látka musí niesť náboj a byť vo vodnom roztoku. Ak sú látky nesúce náboj rozpustené v elektrolyte a umiestnené v elektrickom poli, začnú sa pohybovať konštantnou rýchlosťou úmernou veľkosti ich nábojov, anióny ku anóde, kationy ku katóde. Rýchlosť, ktorou sa ión pohybuje v elektrickom poli, je vyjadrená vzťahom:

$$v = \mu_e E \quad (1)$$

v rýchlosť iónu

μ_e elektroforetická pohyblivosť

E elektrické pole

Elektroforetická pohyblivosť je závislá na náboji, veľkosti, tvare molekuly, ako aj na viskozite, veľkosti pórov, pH pufru, iónovej sile a teplote média. Častice sú pri prechode médium vystavené odporu síl vnútorného trenia. Ich mobilita je výsledkom rovnováhy medzi hnacou silou pôsobiace na ióny v elektrickom poli a brzdiacou silou vnútorného trenia. Malé častice s veľkým nábojom majú veľkú mobilitu, zatiaľ čo veľké častice s malým nábojom majú mobilitu malú. Efektívna mobilita, tj. mobilita, ktorú možno skutočne pri elektroforéze namerať, býva obvykle nižšia než teoretická elektroforetická mobilita a je závislá na pH a použitom pufru. Úspešnú separáciu látok zo zmesi možno dosiahnuť v prípade, že separované látky majú dostatočne odlišné efektívne elektroforetické pohyblivosti [1, 57].

1.8.1 Nosiče v elektroforéze

V elektroforéze sa v súčasnosti najčastejšie používajú dva druhy médií – agaróza a polyakrylamid.

Agaróza: Agaróza je polysacharid tvorený galaktózou a anhydrogalaktózou. Agaróza má schopnosť tvoriť veľké póry, až do veľkosti 0,15 μm v 1% géle. Záporný náboj v matici (z karboxy- a sulfo- skupín) môže spôsobiť elektroendoosmózu. Tá vedie k rozmazaným zónam separovanej látky. Pohyb molekúl v elektrickom poli je brzdený zrážkami s molekulami agarózy a veľkosťou pórov v štruktúre gélu. Princíp molekulového sita sa pri bežne používaných koncentráciách agarózy neuplatňuje, čím je umožnené delenie i veľkých molekúl. Z toho vyplýva nedostatočná citlivosť a rozlíšenie pre separáciu proteínov a peptidov, agaróza je vhodná ako médium pre separáciu nukleových kyselín. Metóda je účinná na bielkoviny len v kombinácii s ďalším separačným parametrom, napr. ako imuno elektroforéza alebo afinitná elektroforéza. Jediná metóda vhodná pre bielkoviny za použitia agarózy je izoelektrická fokusácia [1, 55].

Polyakrylamid: Polyakrylamidové gély sa vyznačujú veľmi nízkou elektroendoosmózou, vysokou mechanickou a chemickou stabilitou a jasným pozadím. Princíp spočíva v chemickej polymerizácii za pomoci katalytického systému persíran amónny (APS) a N,N'-tetrametyléndiamín (TEMED). Veľkosť pórov je daná pomocou hodnoty T – celková koncentrácia monoméru, tj. akrylamid (AA) + N,N-metylenbisakrylamid (BIS) a hodnoty C – zosieťovací faktor (2). A a B sú množstvá AA a BIS vyjadrené v gramoch. V bolo definované Hjerténom ako objem pridaného pufru, ale chápe sa skôr ako celkový objem roztoku. T sa u PAGE pohybuje v rozmedzí od 10 do 20%. C je zvyčajne v rozmedzí od 3 do 10% .

$$T = \frac{(A + B)100}{V} \% \quad \text{a} \quad C = \frac{B100}{(A + B)} \% \quad (2)$$

Čím je hustota polymerizovaného gélu vyššia, tým je pohyb molekúl pomalší [1, 55].

1.8.2 Aparatúry

Vo vertikálnom systéme gél polymerizuje medzi dvoma sklenenými platňami. V tomto systéme dochádza aj priamo k následnej separácii. Vzorky sú nanášané na vrch gélu do jamôk pripravených pomocou formy v tvare hrebeňa. Výhodou tohto systému je možnosť separácie viacerých vzoriek zároveň. V horizontálnom systéme prebieha separácia na otvorenom géle, ten je viazaný na tenkú sklenenú dosičku alebo pomocou filmu. Vzorky sú nanesené do jamôk vytvorených na povrchu gélu. Kvôli disipácii Joulovho tepla a kvôli separácii za definovaných podmienok (napr. teplota) je k zariadeniu vždy pripojený termostatický cirkulátor [1].

1.8.3 Gélové elektroforetické metódy

1.8.3.1 Disková (diskontinuálna) elektroforéza

Disková elektroforéza je veľmi rozšírený spôsob separácie predstavený už v roku 1964 Ornsteinom. Elektrodový pufr obsahuje Tris-glycín, separačný gél je pripravený ako 10% T z Tris/HCl o pH 8,8, zaostrovací gél ako 4% T z Tris/HCl o pH 6,8. V zaostrovacom géle dochádza ku zakoncentrovaniu vzorky v izotachoforickom systéme. V separačnom géle dochádza k deleniu proteínov na základe pravidiel zónovej elektroforézy [1].

1.8.3.2 Gradientová gélová elektroforéza

Gradientová gélová elektroforéza vylepšuje rozlíšenie separácie, a to použitím gélov so stupňujúcou sa porozitou. Výhodou tejto techniky sú ostré zóny proteínov, možnosť separácie bielkovín so širokým rozsahom molekulovej hmotnosti na jednom géle a tiež je možné pomocou nej určiť molekulové hmotnosti natívnych proteínov a glykoproteínov [1].

1.8.3.3 Prídavné látky v elektroforéze

Prídavné látky v elektroforéze sú nevyhnutné pri analýze hydrofóbných proteínov alebo pri analýze vysoko komplexných vzoriek. Disulfidické väzby medzi polypeptidmi tvoria agregáty. Tie môžu byť rozštiepené pomocou tiolových činidiel ako dithiothreitol či β -merkaptoethanol. Keďže tieto redukujúce činidlá inhibujú polymerizáciu, môžu byť pridané do už predpolymerizovaného gélu rehydratáciou alebo priamo do katódového pufru. Močovina za vysokých koncentrácií (8 mol/l) zlepšuje rozpustnosť vzoriek a predchádza agregácii. Avšak gély musia byť tým pádom pripravené vždy čerstvé, pretože močovina degraduje v roztoku na izokyanát, ktorý spôsobuje karbamyláciu proteínov. Neionogénne detergenty ako napríklad Triton X-100 sú pridávané pre rozpustenie hydrofóbných proteínov. Nemenia náboj proteínov a sú často pridávané do močovinových gélov. Obojaký detergent ako napríklad CHAPS zlepšuje rozpustnosť proteínov. Nemení náboj proteínov. Aniónové (SDS) a kationové (CTAB) detergenty menia náboj proteínov a denaturujú ich [1].

1.8.3.4 SDS elektroforéza

Princíp SDS elektroforézy spočíva v prídavku detergentu SDS do proteínovej vzorky a do separačného pufru. 1,4 g SDS je viazaného na 1 g proteínu a tvoria sa elipsoidné micely. Všetky micely majú záporný náboj, ktorý maskuje individuálny náboj jednotlivých bielkovín. Dochádza tiež k rozštiepeniu vodíkových väzieb a rozvinutiu polypeptidov. Rušia sa aj hydrofóbne interakcie [1].

Výhodou SDS elektroforézy je fakt, že je vhodná na stanovenie relatívnej molekulovej hmotnosti bielkovín. Molekulovú hmotnosť jednotlivých bielkovín je možné vypočítať z $\log M_r$ versus pozícia R_f . R_f sa určí ako podiel vzdialenosti molekuly bielkoviny od štartu a čela

vzorkovacieho pufru od štartu. Molekulová hmotnosť sa stanoví z kalibračnej krivky, na ktorú sa použijú štandardy bielkovín [1, 55].

Vzorka na SDS elektroforézu môže byť pripravená za redukujúcich aj neredukujúcich podmienok. Redukujúce podmienky znamenajú, že proteíny sú kompletne rozvinuté, keď sa do vzorky pridá DTT alebo β -merkapt ethanol a vzorka sa povarí pri 95°C aspoň 3 minúty. Neredukujúce podmienky sú dosiahnuté inkubáciou s 1% SDS pufrom bez redukujúceho činidla. Tieto podmienky sa používajú hlavne pre fyziologické vzorky ako napríklad sérum či moč. U týchto vzoriek je potrebné nezničiť kvartérnu štruktúru imunoglobulínov. Disulfidové väzby nie sú rozštiepené a preto tieto proteíny nie sú úplne rozbalené [1].

Výhodou SDS elektroforézy je skutočnosť, že SDS zavádza do roztoku takmer všetky proteíny, dokonca aj veľmi hydrofóbne a denaturované. Proteíny putujú všetky v jednom smere, k anóde. Dá sa určiť molekulová hmotnosť proteínov. Pomocou SDS elektroforézy sa dá dosiahnuť vysoké rozlíšenie a jasné zóny bielkovín [1].

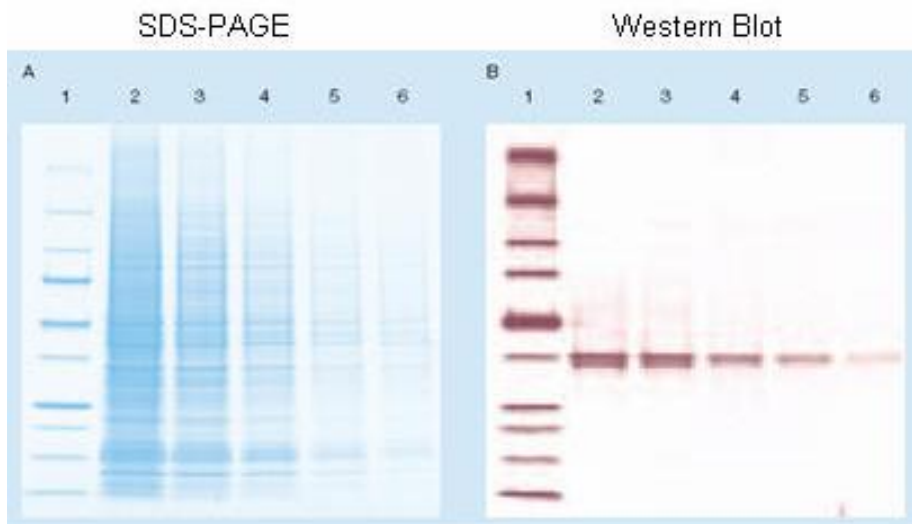
Farbenie gélov prebieha za použitia farbiva Coomassie Brilliant Blue. Vyššia citlivosť sa dá dosiahnuť použitím farbenia striebrom. Táto procedúra je však časovo náročnejšia, pretože pozostáva z viacerých krokov. Je zároveň nevratná [1].

1.8.3.5 Izoelektrická fokusácia

V princípe je izoelektrická fokusácia rovnovážna metóda. Proteíny migrujú k ich izoelektrickým bodom. Amfotérna molekula nesúca náboj sa pohybuje vplyvom elektrického prúdu v gradiente pH až do okamihu, kedy sa dostane do oblasti pH zhodnej s jej izoelektrickým bodom a jej pohyb sa zastaví. Každá molekula je zaostrená do úzkej zóny okolo svojho izoelektrického bodu. Týmto spôsobom je možné od seba oddeliť molekuly, ktorých izoelektrický bod sa líši o 0,001 jednotky pH. V polyakrylamidovom géli sa pod vplyvom elektrického poľa zmes týchto polyamfolytov zoradí podľa svojich izoelektrických bodov tak, že najkyslejšie sa zhromaždia u anódy a smerom ku katóde sa radia amfolyty so stúpajúcou bázicitou. Známe sú dva typy amfolytov – voľné a imobilizované. Izoelektrická fokusácia sa využíva prevažne pre analytické účely, pre stanovenie izoelektrického bodu separovaných látok, stanovenie titračných kriviek a k identifikácii jednotlivých zložiek separovaných zmesí. Sú známe aj preparatívne použitia [1, 57].

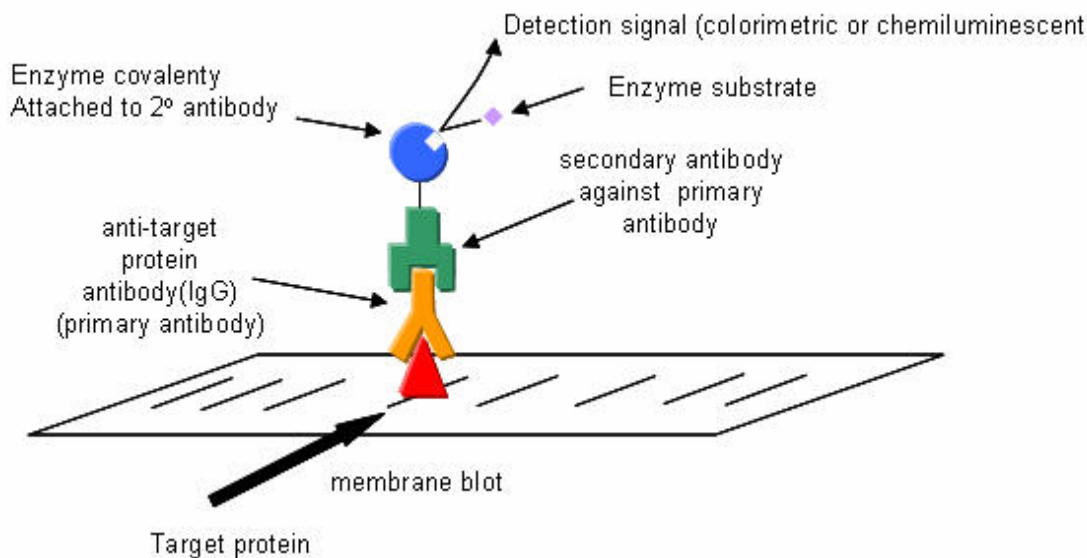
1.8.3.6 Western blotting

Western blot je metóda, ktorá umožňuje detekovať určitý proteín v zmesi proteínov. Aplikuje sa po gélovej elektroforéze namiesto tradičného farbenia gélu. Elektroforéza síce delí proteíny podľa veľkosti, avšak nehovorí už nič o tom, či sú proteíny podobné, len či majú podobnú hmotnosť. Po rozdelení proteínov elektroforézou dochádza k transferu proteínov na PVDF alebo nitrocelulóзовú membránu. Transfer prebieha rovnakým princípom ako klasická elektroforéza a proteíny migrujú z gélu na membránu. Keď sú proteíny prenesené na membránu, tak môže začať samotný blotting. Pomocou polyklonálnych alebo monoklonálnych protilátok špecifických k proteínu, dôjde k detekcii cieľového proteínu vo vzorke [1].



Obr. 7 Ukážka rozdielu výsledného vzhľadu analýzy medzi PAGE-SDS a Western Blot[68]

Samotná detekcia prebieha nasledovne: najskôr sa membrána ponechá inkubovať s látkou, ktorá obsadí všetky miesta na membráne, kam sa nepreniesli proteíny pri prenose a kam by sa potenciálne mohla naviazať primárna protilátka nešpecifickou interakciou s membránou. Potom sa pridá primárna protilátka, tj protilátka proti cielenému proteínu, ktorá s ním špecificky interaguje. Po inkubácii a premytí sa pridá sekundárna protilátka, tj protilátka proti primárnej protilátke. Sekundárna protilátka je špecificky značená (napríklad spojením s chrenovou peroxidázou), ktorá potom katalyzuje určitú enzymatickú reakciu. Blot sa vyvolá tým, že spomínaná chrenová peroxidáza je použitá v spojení s chemiluminiscenčnou látkou a produkt reakcie po katalýze peroxidázou vykazuje luminiscenciu, ktorá je detekovaná použitím fotografického papiera alebo pomocou špeciálnej CCD kamery [69].

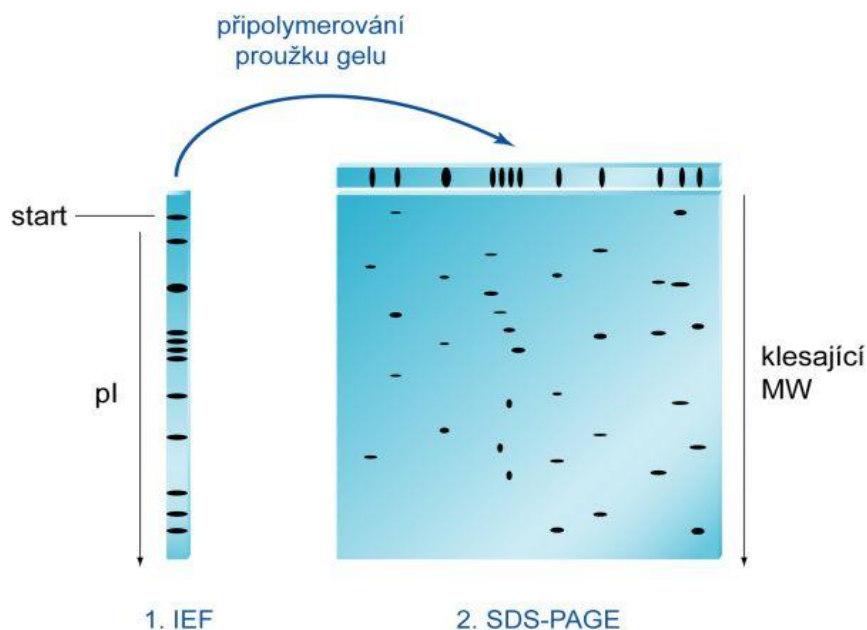


Obr. 8 Princíp detekcie v metóde Western blot [68]

Výhodou metódy je pomerne jednoznačná identifikácia proteínu v zmesi proteínov. Nevýhodou však je nutnosť mať špecifickú primárnu protilátku, inak je western blotting neuskutočniteľný [69].

1.8.3.7 Dvojdimenziálna elektroforéza (2-DE)

2D elektroforéza je spojením izoelektrickej fokusácie a SDS elektroforézy. Spojením týchto metód sa naskytla možnosť analýzy proteínov v rádoch stoviek až tisícok zároveň na jednom géle. Metóda má veľkú rozlišovaciu schopnosť, pretože dochádza k deleniu proteínov podľa fyzikálno-chemických vlastností – náboja a veľkosti, ktoré sú na sebe úplne nezávislé [1].



Obr. 9 Princíp 2D elektroforézy: Vo vodorovnom smere izoelektrická fokusácia, vo zvislom smere elektroforéza v prítomnosti dodecylsírany sodného [70]

Princíp a prevedenie 2D elektroforézy

Princíp 2D elektroforézy bol prvýkrát predstavený O'Farrellom (1975) a Klosem (1975). Tradičná technika 2D elektroforézy zahŕňala extrakciu proteínov pomocou lyzačný pufru obsahujúceho SDS a β -merkaptóethanol. Izoelektrická fokusácia prebiehala v polyakrylamidových gélových trubičkách o hrúbke 1–3 mm a hodnote T 4–5% za denaturujúcich podmienok (močovina, neiónogénny detergent). Po fokusácii boli vzorky ponechané v 1% roztoku SDS a následne bola prevedená separácia na PAGE klasickom géle na základe molekulových hmotností. Škrvy boli detekované farbením, imunoblottingom, autoradiografiou a fluorografiou. Avšak tento postup sa ukázal ako nevyhovujúci, hlavne kvôli nedostatočnej reprodukovateľnosti hlavne v prvom kroku, tj počas izoelektrickej fokusácie. Dochádzalo tiež k strate bázických a kyslých proteínov vplyvom gradientu [1, 2].

Preto bola vyvinutá nová metóda (Görg 1988, 1995). Jedná sa o použitie vysušených gélov obsahujúcich imobilizovaný pH gradient (IPG). Tie sú nastrihané na 3 – 5 mm pásy (IPG strips). Pred použitím dôjde k rehydrácii na originálnu hrúbku v roztoku močoviny, CHAPS, DTT a zmesi amfolytov, najčastejšie cez noc a následne sú pásy pripravené na použitie k separácii v prvej dimenzii. Vzorky sú nanášané pomocou aplikátora na anódový alebo katódový koniec rehydrovaného pásu, alebo je suchý pás priamo rehydrovaný spoločne so vzorkou. Táto metóda má vysoké rozlíšenie aj pri nízkych pH gradientoch. Výhodou je tiež zlepšená reprodukovateľnosť a možnosť nanesenia väčšieho množstva vzorky [1].

Izoelektrická fokusácia na imobilizovaných pH gradientových pásoch prebieha v horizontálnej komore pri 20°C niekoľko hodín. Následne sú pásy ekvilibrované v SDS pufre a prenesené na SDS gél na delenie v druhej dimenzii. SDS elektroforéza je menej kritickým krokom než izoelektrická fokusácia. Používa sa vertikálne usporiadanie aparatury, najmä kvôli možnosti súbežnej analýzy viacerých gélov. Pre lepší prechod z jednej dimezie do druhej sa používa na uchytenie IPG pásu agaróza. Po separácii môžu byť gély porovnávané pomocou databázových programov alebo online databáz [1].

Výhodou 2D elektroforézy je, že proteíny môžu byť ďalej purifikované bez predchádzajúcej znalosti ich vlastností. Vďaka vysokému rozlíšeniu vo väčšine prípadov jeden spot zodpovedá jednému proteínu [1].

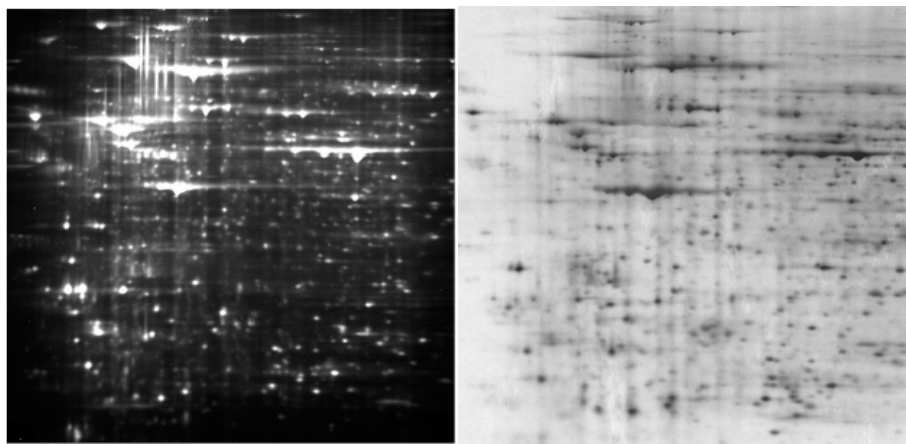
Príprava vzorky pre 2-DE

Samotná príprava vzorky pred 2D elektroforézou je jedným z najdôležitejších krokov vôbec, zároveň je ale aj jedným z najproblematickejších. Je potrebné si uvedomiť, aký má byť výsledok separácie. Či maximálny počet proteínov vo vzorke, alebo skôr špecifické proteíny. Proteíny, ktoré chceme stanoviť, musia byť úplne rozpustné za elektroforetických podmienok. Sú potrebné rôzne podmienky izolácie na rozpustenie rôznych proteínových vzoriek: niektoré proteíny sú v membránových komplexoch alebo v komplexoch s inými proteínmi, iné sa zasa zrážajú, ak je odstránené ich prirodzené prostredie. Všeobecne platí, že čím jednoduchšia izolácia proteínov, tým lepšie. Je zároveň dôležité minimalizovať interferencie činidiel, ktoré ostali vo vzorke z predchádzajúcich izolačných krokov (solí, SDS, inhibítory proteáz). Vzorka, napríklad bunky, by mali byť premyté v pufre s nie príliš veľkou iónovou silou a následne by mali byť fyzikálne alebo chemicky rozštiepené. Dezintegrácia buniek by mala prebehnúť za podmienok brániacich proteolýze a ostatným degradáciám proteínov. Mala by byť použitá čo najnižšia teplota s minimálnym generovaním tepla. V závislosti na druhu buniek sa môže použiť french press, sonifikácia, enzymatická lýza, či mechanická homogenizácia. Zároveň je nutné odstránenie zvyškov DNA a RNA. Je tiež potrebné eliminovať účinky proteolytických enzýmov, ktoré môžu potom interferovať v proteínových mapách. V tomto prípade sa využívajú inhibítory proteáz (PMSF). Na analýzu len určitej časti proteínov sa používa prefrakcionácia, najčastejšie pomocou ultracentrifugácie. V prípadoch, keď vzorka nie je dostatočne koncentrovaná, sa využíva vyzrážanie bielkovín pomocou acetónu alebo kyseliny trichloroctovej. Vzorkový pufr, ktorý sa pridáva do vzorky pred nanesením na gél, solubilizuje a degraduje proteíny. Prítomnosť vysokej koncentrácie chaotropných činidiel (močovina, thiomočovina) bráni asociácii proteínov vodíkovými mostíkmi. Neiónové detergenty (CHAPS, TRITON X-100) zaisťujú rozpustnosť

hydrofóbných častí bielkovín. Redukčné činidlá (DTT, β -merkapt ethanol) zamedzujú vzniku disulfidických mostíkov, amfolyty alebo Tris pufrujú pH [2, 71].

Farbenie a vyhodnotenie gélov po 2D elektroforéze

Po elektroforéze sú proteíny na géle vizualizované pomocou farbenia striebrom (analytické gély) alebo pomocou Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 (preparatívne gély). Najcitlivejšie je farbenie striebrom, avšak roztok obsahuje glutaraldehyd, ktorý interferuje s Edmanovou identifikáciou alebo MS sekvenovaním. Preto sa zvyčajne používa farbenie CBB, je totiž možná následná charakterizácia proteínu. Vysoká citlivosť sa dá dosiahnuť tiež použitím fluorescenčných farbív SYPRO Orange a Ruby, ktorých použitie je však finančne náročné. Tieto farbivá sú dostatočne citlivé a pritom umožňujú kvantitatívne stanovenie proteínu. Viazu sa na SDS, nie na proteín, a tým pádom vylučujú odfarbovací proces. Ich nevýhodou okrem ceny je však tiež nevyhnutnosť vlastniť špeciálne fluorescenčné zariadenie na vyhodnocovanie gélov [4].



Obr. 10 Porovnanie fluorescenčného farbenia gélov farbivom SYPRO Ruby (vľavo) s farbením striebrom (vpravo) [72]

Hlavným dôvodom zaradenia 2D elektroforézy je tvorba proteínovej mapy, ktorá vychádza zo zrovnania obrazu 2D gélov. V prvej fáze je obraz nasnímaný pomocou využitia CCD kamery, denzidometru a skeneru pre snímanie obrazu vo viditeľnom svetle, pomocou prístroja pre detekciu fluorescencie, či pomocou prístroja citlivého na rádioaktívne žiarenie. Špeciálny software umožňuje detekovať škvrny na 2D géle, odčítať pozadie, navzájom priradovať škvrny na rôznych 2D géloch (matching), vzájomne štandardizovať a kvantitatívne vyhodnocovať gély, čím sú čiastočne eliminované nepresnosti, ktoré vznikli v priebehu komplikovanej 2D elektroforézy a pri farbení gélu. Je tiež možné konštruovať proteínové mapy a obrazové databázy [2].

1.9 Príprava vzoriek pre analýzu štruktúry proteínov

Prvým krokom v identifikácii proteínov je ich izolácia a purifikácia. Druhým krokom je špecifické štiepenie peptidových väzieb proteínov na peptidy, ktoré je prevádzané pomocou

enzýmov. Následne je zmes peptidov identifikovaná niektorou z metód MS. Schéma možností postupov pre identifikáciu proteínov je znázornená v podrobnej schéme (viď Príloha 1) [73].

Väčšina analytických metód používaných na analýzu štruktúry proteínov (analýza sekvencií aminokyselín, hmotnostná spektrometria) vyžaduje čisté vzorky bez kontaminantov, akými sú soli, detergenty, či farbivá. Pri väčších množstvách vzorky nie je problém použiť tradičné metódy, tj vyzrážanie, ultrafiltráciu, dialýzu, či gélovú elektroforézu. Avšak pri práci v mikromerítke, s minimálnym množstvom proteínu, je každá strata dôležitá. Dochádza napríklad k hydrofóbnym či hydrofilným interakciám s povrchmi [1].

Najčastejšia situácia, pri ktorej nastáva nutnosť odstránenia solí, je po enzymatickom štiepení proteínu. Riešením je použitie vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s reverznou fázou (RP-HPLC), membrány, ktoré sú schopné viazať proteíny, či odsoľovanie na mikrokolónach [1].

Odstránenie hydrofóbných látok zo vzoriek proteínov je podstatne náročnejšie než odstránenie hydrofilných látok. Preto sa odporúča používať detergenty pri separácii proteínov v minimálnom množstve. Ich odstránenie často spôsobuje problémy v rozpustnosti proteínov nasledované vyzrážaním alebo agregáciou proteínov. Preto musí byť sprevádzané inými druhmi rozpustných činidiel, napr. silnými kyselinami či chaotropnými látkami, aby boli proteíny udržané v roztoku [1].

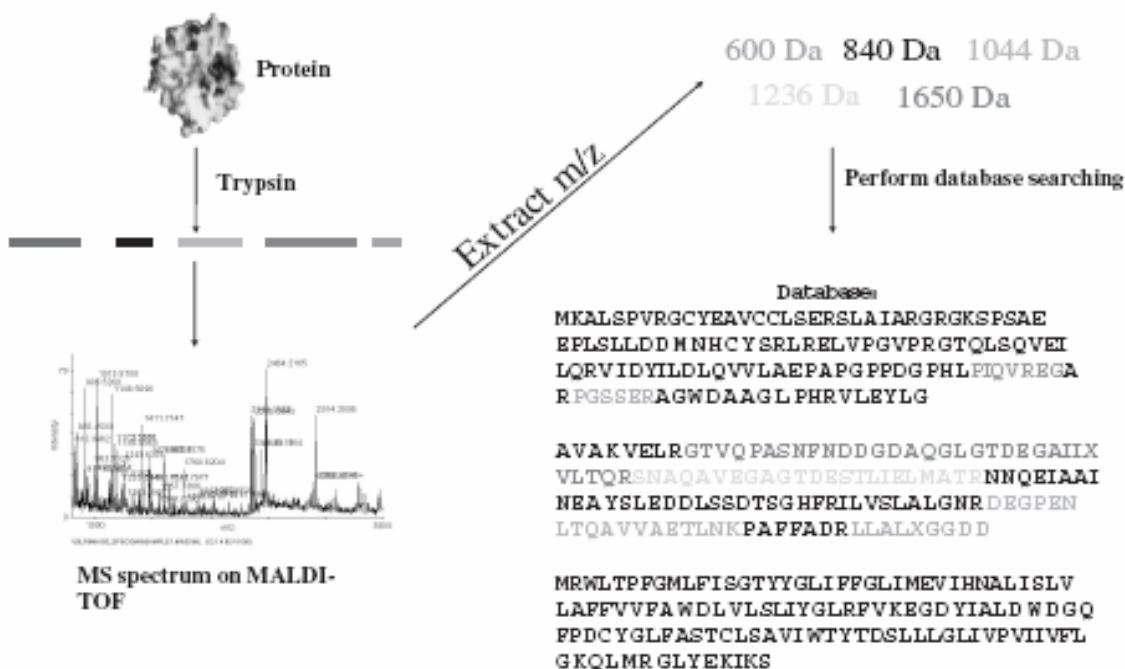
1.10 Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria (mass spectrometry, MS) sa používa už niekoľko desaťročí pre štúdium nízkomolekulárnych látok. Avšak táto tradičná metóda nemala využitie pri stanovení nederivatizovaných látok s veľkou molekulovou hmotnosťou. Hlavným problémom bola konverzia nepolárnych a neprchavých biomolekúl do intaktných izolovaných molekúl v plynnej fáze. Až v posledných dvoch dekádach sa začala používať aj na stanovovanie biomolekúl, najčastejšie ako metóda MALDI-TOF a tandemová hmotnostná spektrometria MS/MS [1, 74].

1.10.1 Hmotnostná spektrometria MALDI-TOF-MS

1.10.1.1 História a súčasnosť MALDI-TOF

Metóda MALDI-TOF je dôležitým nástrojom pre analýzu proteínov kvôli schopnosti analyzovať femtomólové množstvá proteínových zmesí v krátkom čase. Metódu MALDI ako ionizačnú metódu pre veľké molekuly prvýkrát predstavili Hillenkamp a Karas v roku 1988. V ich originálnej práci bola použitá nikotínová kyselina ako matrica a Nd:YAG laser. Pokrok priniesol používanie nových matric, ako napríklad deriváty kyseliny škoricovej alebo kyseliny 2,5-dihydroxybenzoovej. Tieto matrice môžu byť použité s jednoduchými dusíkovými lasermi a zároveň patria k najpoužívanejším matriciam pre MALDI MS analýzu proteínov a peptidov [75, 76].



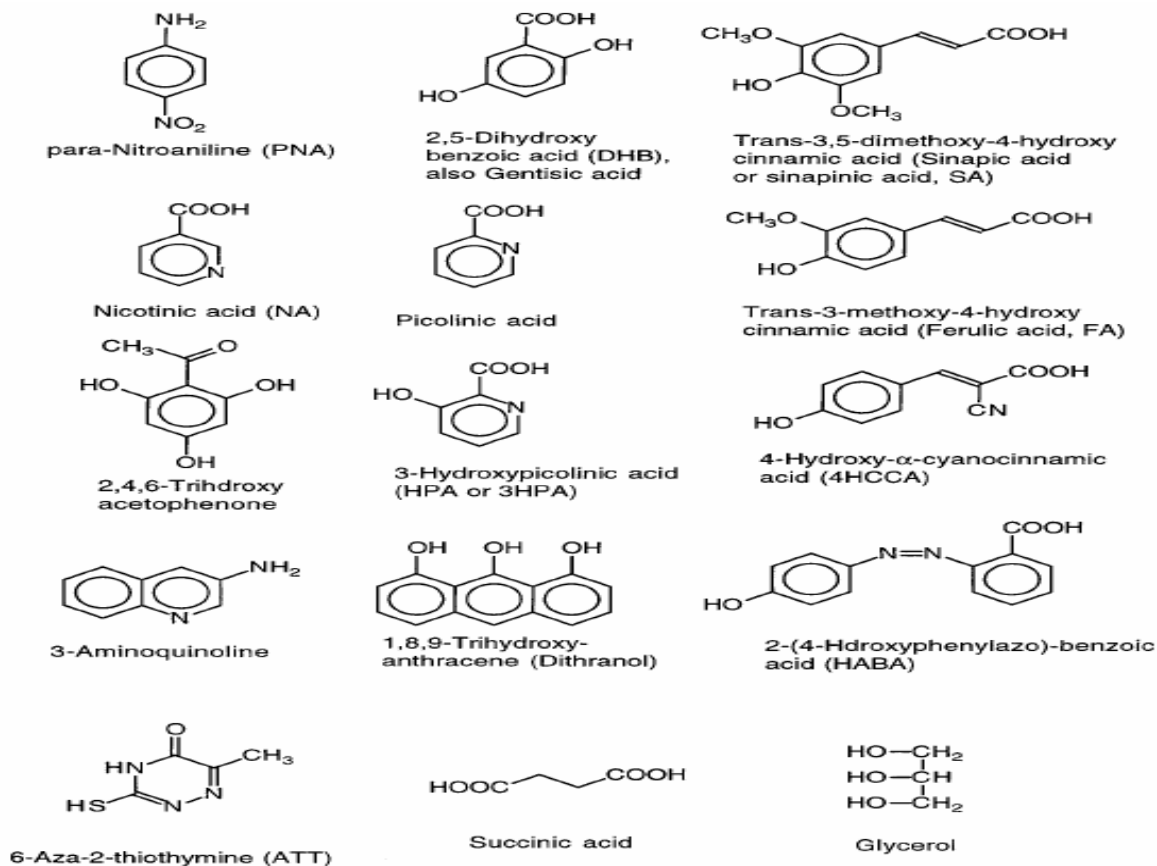
Obr. 11 Schéma identifikácie proteínov založená na MALDI-TOF a peptidovom mapovaní („peptide mass fingerprinting“). Proteín je rozštiepený trypsínom a zmes peptidov je analyzovaná pomocou MALDI-TOF. Namerané hodnoty m/z sa využívajú na hľadanie v proteínových a DNA databázach s cieľom identifikovať proteín [77].

Hmotnostná spektrometria je metóda, ktorá umožňuje presné meranie molekulovej hmotnosti širokej škály látok. Keďže skúmaná látka musí byť prevedená ako intaktná do plynnej fázy, využitie hmotnostnej spektrometrie pre analýzu proteínov bolo umožnené vývojom tzv. "mäkkých" ionizačných techník hmotnostnej spektrometrie, kam sa radí laserová desorpcia/ionizácia za účasti matrice (MALDI) a ionizácia elektrosprejom (ESI). Proteín sa môže identifikovať dvoma spôsobmi. V prvom spôsobe je naštiepený trypsínom alebo iným proteolytickým enzýmom na menšie peptidy, ktorých hmotnosti sú zmerané pomocou MS. Spektrá sú potom porovnávané s databázami. Druhý spôsob, takzvaná tandemová MS umožňuje zvoliť peptid, ktorý je následne fragmentovaný kolíziou s inertným plynom. Výsledný profil fragmentácie poskytuje čiastočnú alebo úplnú informáciu o sekvencii proteínu, ktorá sa potom porovnáva s dátami uloženými v databázach [78, 79].

1.10.1.2 Príprava vzorky

Príprava vzorky je jedným z najdôležitejších krokov v MALDI-MS analýze proteínov a peptidov. Príprava vzorky pozostáva z dvoch krokov. Prvým je izolácia a purifikácia samotnej bielkoviny alebo zmesi, bez kontaminantov akými sú pufry, soli, detergenty alebo denaturačné činidlá. Druhým krokom je samotný proces prípravy vzorky na MALDI-MS analýzu, pri ktorej sa nechá študovaná látka vykryštalizovať na kovovej podložnej doske s matricou. Tou bývajú

deriváty nízkomolekulárnych aromatických kyselín, ktoré môžu absorbovať energiu laserového žiarenia vo viditeľnej alebo ultrafialovej oblasti [80].



Obr. 12: Typy používaných matric v MALDI-TOF analýze [81]

Dodnes bolo predstavených viacero metód prípravy vzoriek, avšak jednou z najpoužívanejších je takzvaná „dried-droplet“ metóda. Pri nej dochádza k zmiešaniu vzorky s matricou a k samovoľnému vysušeniu a vykryštalizovaniu vzorky na podložnej doske. Medzi ďalšie používané metódy patria metóda tenkej vrstvy, metóda hrubej vrstvy za použitia nitrocelulózy ako aditíva do matrice, či sendvičová metóda [80].

1.10.1.3 Princíp analýzy

Zmes analytu s matricou sa naniesie na doštičku, ktorá sa po vysušení vzorky zasunie do evakuovaného MALDI-TOF prístroja. K desorpcii a ionizácii vzorky dochádza ožiarením kryštálov zmesi laserovým pulzom. Matrica absorbuje laserové žiarenie, teplotná relaxácia excitovaných molekúl matrice vedie k jej vyparovaniu a tým dochádza aj k prechodu neprchavých molekúl analyzovanej látky do plynnej fázy. Matrica tiež pôsobí ako ionizačné činidlo, pretože protonuje alebo deprotonuje analyzovanú látku, vznikajú pri tom molekuly

analytu s jednotkovým nábojom. Matrica aj laserový záblesk sú volené tak, aby nedochádzalo k fragmentácii molekúl analyzovanej látky [74].

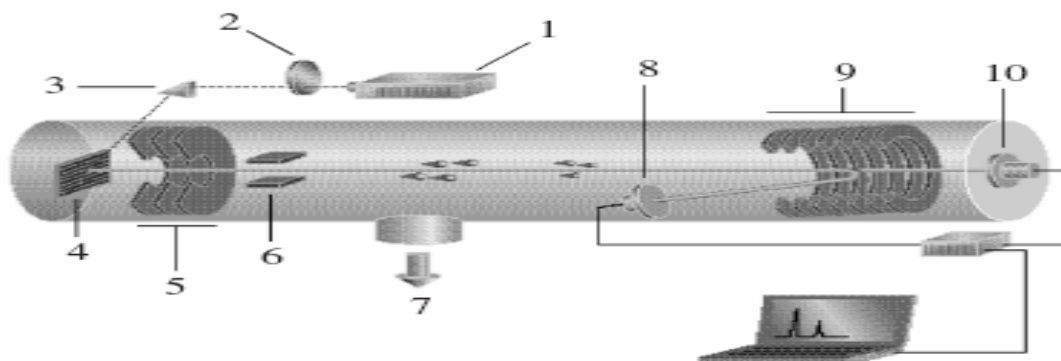
Tab. 8 Používané druhy laserov v MALDI-TOF [81]

Laser	Wavelength	Photon energy (kcal/mol)	Photon energy (eV)	Pulse width
Nitrogen	337 nm	85	3.68	<1 ns – few ns
Nd:YAG × 3	355 nm	80	3.49	typ. 5 ns
Nd:YAG × 4	266 nm	107	4.66	typ. 5 ns
Excimer (XeCl)	308 nm	93	4.02	typ. 25 ns
Excimer (KrF)	248 nm	115	5.00	typ. 25 ns
Excimer (ArF)	193 nm	148	6.42	typ. 15 ns
Er:YAG	2.94 μm	9.7	0.42	85 ns
CO ₂	10.6 μm	2.7	0.12	100 ns + 1 μs tail

Hmotnosť iónu v MS sa všeobecne určuje zmeraním jeho rýchlosti po urýchlení v elektrickom poli. V TOF spektrometri sa meria čas letu iónu hlavne v oblasti s nulovým elektrickým poľom po dodaní definovanej kinetickej energie. Pulzný laser totiž presne určí okamih vzniku iónu. Detektor umiestnený na konci separátoru meria čas letu každého iónu. Časticiam s rovnakým nábojom je urýchlením v elektrickom poli dodaná rovnaká kinetická energia. Z toho vyplýva, že ľahké ióny sa pohybujú rýchlejšie než ťažké. V rovnici (3) je popísaný vzťah medzi dobou letu a hmotnosťou iónu, kde t je doba letu, U urýchľovacie napätie, z náboj iónu a m hmotnosť iónu.

$$t = konst. \times \sqrt{\frac{m/z}{U}} \quad (3)$$

Zo vzťahu vyplýva, že v skutočnosti sa nemeria hmotnosť, ale pomer hmotnosť/náboj pre každý ión [74].



Obr. 13. Schéma MALDI-TOF hmotnostného spektrometru; 1 - laser, 2 - regulačný filter, 3 - optický hranol, 4 - doska so vzorkou, 5 - urýchľovacie napätie, 6 - deflektor, 7 - vákuové pumpy, 8 - reflektorový detektor, 9 - reflektor, 10 - lineárny detektor [74]

Metóda MALDI-TOF-MS sa využíva na stanovenie molekulových hmotností, identifikáciu pomocou peptidového mapovania, sekvenovanie bielkovín, štúdium posttranslačných modifikácií a zistenie priestorového usporiadania bielkovín. Často býva využitý predchádzajúci separačný krok pre získanie danej proteínovej frakcie. Ním je 1D alebo 2D gélová elektroforéza, prípadne kvapalinová chromatografia [80].

1.10.2 Tandemová hmotnostná spektrometria MS/MS

Tandemová hmotnostná spektrometria (MS/MS) sa používa na získanie informácie o štruktúre skúmanej látky fragmentáciou špecifických iónov vzorky v hmotnostnom spektrometri a identifikovaním výsledných fragmentovaných iónov. Tandemová hmotnostná spektrometria umožňuje detekciu špecifických látok v komplexných vzorkách na základe ich špecifických a charakteristických fragmentových profilov [82].

Tandemová hmotnostná spektrometria je hmotnostná spektrometria, ktorá má viac než jeden hmotnostný analyzátor, v praktickom použití zvyčajne dva. Tieto analyzátory sú oddelené kolíznou celou, v ktorej je inertný plyn (argón, xenón), ktorý koliduje s iónmi vzorky a spôsobuje ich fragmentáciu. Analyzátory môžu byť rovnakého alebo rôzneho typu, najčastejšie kombinácie sú kvadrupól – kvadrupól, magnetický sektor – kvadrupól, magnetický sektor – magnetický sektor a kvadrupól – TOF [82].

Najčastejším využitím metódy MS/MS je peptidové sekvenovanie. Peptidovým sekvenovaním je možné zistiť kovalentnú štruktúru peptidu. Analýza prebieha tak, že peptidu, u ktorého sa chce zistiť jeho sekvencia, je dodaná energia, ktorá vyvolá fragmentáciu a následne je zmerané hmotnostné spektrum fragmentov. Väčšina peptidov a proteínov sú lineárne polyméry, preto prerušením jedinej kovalentnej väzby v reťazci vznikajú rôzne typy iónov v závislosti na mieste prerušenia peptidového reťazca. Vznikajú dve častice obsahujúce N- a C-koncovú časť peptidu. Aby bola vzniknutá častica detekovaná, je potrebné, aby niesla aspoň jeden náboj. Pri fragmentácii však môže dôjsť k prerušeniu aj viac než jednej peptidovej väzby. Vznikajú tak interné fragmenty. Pomocou nich sa potvrdzuje výskyt danej aminokyseliny v sekvenovanom peptide [82].

1.10.3 LC/MS

Prepojenie kvapalinovej chromatografie ako separačnej techniky s hmotnostným detektorom patrí medzi najpoužívanejšie analytické metódy. Jej začiatky však neboli jednoduché najmä preto, že medzi jednotlivými komponentami systému panujú veľké rozdiely v hodnotách tlaku (HPLC pracuje za atmosférického tlaku, MS za vákua). Ďalším problémom bolo odstránenie nadbytku mobilnej fázy nesúcej vzorku pred vstupom do vákuovej časti prístroja. Systém má však svoje výhody najmä v tom, že kontinuálne prepája separáciu, identifikáciu a kvantifikáciu [83].

Štandardne sa používajú ako zdroje ionizácie elektrosprej a chemická ionizácia za atmosférického tlaku. Ako analyzátor je najčastejšie používaný kvadrupól alebo iónová pasca [84].

1.10.4 Analýza peptidov pomocou MS

Hmotnostná spektrometria je najvýznamnejšou metódou identifikácie proteínov, či už známej alebo neznámej sekvencie. Pretože samotné stanovenie molekulovej hmotnosti pre identifikáciu proteínu nestačí, používajú sa aj ďalšie metódy, u ktorých dochádza k deleniu proteínu na menšie časti, peptidy. Delenie môže prebehnúť fragmentáciou alebo pomocou špecifického štiepenia. Na základe informácie o jednom peptide (MS/MS) alebo o skupine peptidov (peptidové mapovanie) je možné identifikovať pôvodný proteín. Pri peptidovom mapovaní je proteín enzymaticky štiepený trypsínom na peptidy. Zmes peptidov je analyzovaná pomocou MALDI-TOF. Hmotnosti peptidov odčítané zo spektra po analýze sa porovnávajú s dátami v databázach. Výsledkom je zoznam proteínov, štiepením ktorých mohli vzniknúť peptidy o daných molekulových hmotnostiach. Pravdepodobnosť identifikácie pôvodného proteínu určuje pomer nájdených vs. zadaných peptidov (tzv. „expectation faktor“), či percento pokrytia sekvencie. Podmienkou pre úspešné stanovenie je vysoká presnosť pomeru m/z a tiež nízky počet pôvodných proteínov vo vzorke. Ideálne je, ak sa vo vzorke nachádza len jeden proteín. Ak je proteín v zmesi proteínov, tak musí byť pred analýzou oddelený [82].

Ak sa proteín nedá identifikovať klasicky pomocou MS (napríklad ak proteín nie je vedený v databázach), je možné využiť pre získanie sekvencie aminokyselín techniku peptidového sekvenovania. Jednotlivé peptidy môžu byť vybrané po prvej MS analýze, pričom sú podrobené MS/MS analýze. Tento typ analýzy používa viacnásobné kolá MS analýzy delenej určitou formou fragmentácie. Na tento typ analýzy sa využíva spektrometer, ktorý má dva detektory – kvadrupól a TOF. Kvadrupól izoluje peptidový ión, ktorý nás zaujíma, od ostatných proteínov. Potom je peptid poslaný do kolíznej cely, kde kolидуje s neutrálnymi plynnými molekulami (hélium, dusík, argón) a fragmentuje sa na malé kúsky. Tieto fragmenty sú detekované druhým analyzátorom (TOF), výsledkom čoho je spektrum, z ktorého je jasná kompletná alebo čiastočná sekvencia aminokyselín z daného peptidu [82].

1.11 Mikrofluidné techniky

Bioanalytické zariadenia v mikromerítke (tiež nazývané laboratory-on-chip) sú vysoko efektívne platformy pre súčasnú analýzu veľkého množstva biologicky dôležitých molekúl. Majú obrovský potenciál pre štúdium genómu, proteómu aj metabolómu. Vývoj a implementácia mikrofluidných metód ovplyvňuje aj zakladanie a vývoj nových technológií, ako napríklad mikrolitografia, mikrostrojné inžinierstvo, mikroelektromechanické systémy, či nanotechnológie. Pokrok v mikrofluidnej oblasti je zameraný hlavne na rýchlo sa rozvíjajúce odvetvia genomiky, proteomiky a metabolomiky. Je evidentný obrovský potenciál pre mikrozariadenia v diagnostike, vývoji liečiv, či zavádzaní nových farmaceutík, pretože tieto zariadenia dokážu uspokojiť dopyt po vysokovýkonných veľkokapacitných aplikáciách. Hlavnými výhodami týchto zariadení je zlepšené prevedenie, rýchlosť a výkonnosť, redukcia ceny, nízka spotreba chemikálií a už spomínaná možnosť paralelnej a integrovanej analýzy [85].

Hlavným cieľom výskumu v oblasti mikrofluidiky je implementácia a integrácia rôznych komponentov pracujúcich s kvapalinami (pumpy, ventily, filtre, miešadlá) s analytickými separačnými a detekčnými technikami (elektroforéza, chromatografia, flourescencia,

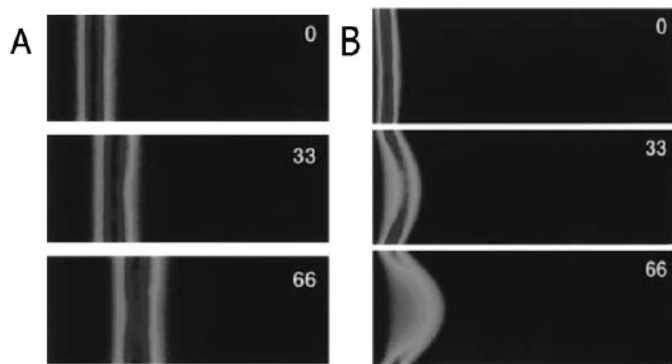
elektrochemická detekcia) do jedného mikro zariadenia na kompletnú on-chip analýzu. Dodnes bola mikrofluidika úspešne aplikovaná na DNA sekvenovanie, PCR amplifikáciu, aminokyseliny, peptidy, proteíny, imunoanalýzu atď.[86].

Konvenčná analýza proteínov spočíva v ich extrakcii z bunky, nasleduje separácia a detekcia v 1D alebo 2D elektroforéze, vyrezanie vzorky z gélu, rozštiepenie na peptidy a analýza výslednej zmesi peptidov pomocou MS. Táto tradičná technika je však pomalá a pracná. Mikrofluidné techniky ponúkajú nové možnosti. Hlavná časť výskumu sa v poslednej dobe zaoberala kombináciou jedno- alebo multi-dimenzionálnej mikrokanálikovej separácie a MS detekcie. Boli predstavené návrhy 2D elektroforézy v mikromerítke, taktiež už bola prevedená izoelektrická fokusácia proteínov v mikročipoch. Predstavená bola tiež elektroforéza v mikročipoch na báze voľnej elektroforézy a SDS elektroforézy [85].

Prvotné mikrofluidné zariadenia boli vyrobené zo silikónu alebo zo skla. Nové mikročipy sú jednorazové a vyrábajú sa z rôznych materiálov, napríklad polydimethylsiloxan (PDMS), či teplom tvrditeľný polyester (TPE). Všetky druhy mikročipov musia byť schopné kontroly toku tekutiny v mikromerítke [86].

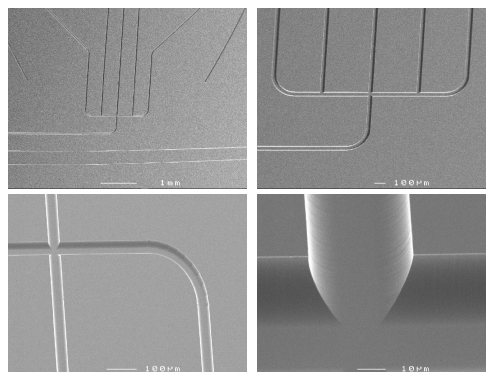
1.11.1 Kontrola toku tekutiny v mikročipe

Existuje široký rozsah metód pre tvorbu toku v mikrofluidných zariadeniach zahŕňajúc použitie elektroosmotického toku, vstrekovanie vzorky, vákuové pumpy, elektrokinetické pumpy, bubliny plynu, či elektrohydrodynamické pumpy. Vo všeobecnosti je pumpovanie v čipe zaistené externými veľkými pumpami, alebo sú pumpy integrované do mikročipu vo forme mikrokomponenty. Väčšina púmp v mikročipoch funguje na elektrokinetickom princípe. Pohyb vzorky v kanáliku čipu je riadený elektroosmotickým tokom (EOF). EOF sa vyskytuje v kapilárnej elektroforéze. Jedná sa o pohyb vzorky v kapiláre alebo kanáliku spôsobený pohybom iónov blízko povrchu stien pod vplyvom aplikovaného elektrického poľa. Pretože pohyb vzorky prebieha blízko pri povrchu, výsledný tok má plochý rýchlostný profil, čo vyúsťuje do minimálnej disperzie vzorky (obr.14, 15) [86].



Obr. 14: Vizualizácia tokových profilov:

A) elektroosmotický tok B) tlakom hnaný tok [86]



Obr. 15 Mikrokanáliky [86]

Plastové čipy majú všeobecne pomalší elektroosmotický tok než čipy vyrobené zo skla. Nie je to však nevýhoda. Za daného aplikovaného potenciálu pomalší EOF korešponduje s dlhšími časmi analýz a dovoľuje efektívnejšie plnenie kanálikov v čipe. Nevýhoda použitia plastových

čipov je nízka stabilita povrchu. EOF je síce populárny mechanizmus v mikrofluidike, avšak jeho použitie nie je vždy možné (nevodné roztoky). Preto sa tiež na zaistenie toku v mikrokanálikoch využíva diferenciálny tlak [86].

1.11.2 Detekcia v mikrofluidných technikách

Medzi najbežnejšie metódy detekcie patria metódy optické, ktoré sú aj najpoužívanejšie, ďalej elektrochemické a detekcia pomocou hmotnostnej spektrometrie [86].

Optická detekcia má rozsiahle využitie v mikrofluidike primárne kvôli jednoduchej implementácii a primeraným nárokom na vybavenie. Z optických metód je najbežnejšia fluorescencia kvôli svojej vysokej citlivosti. Malé rozmery mikrokanálikov a malé objemy dávkovanej vzorky vyžadujú použitie citlivého detektora, akým je laserom indukovaná fluorescencia. Nevýhodou je, že vzorka musí byť fluorescenčne označená, aby mohla byť detekovaná. K označeniu vzorky môže dôjsť pred, počas alebo po ukončená separácie v mikročipe. Proteíny sú fluorescentne označené s reagentami ako fluorescín izothiokyanát (FITC) alebo tetramethylrhodamín izothiokyanát (TRITC), ktoré reagujú s aminoskupinami proteínov. Z ďalších optických metód sú na detekciu využiteľné absorpčná detekcia, Ramanova spektroskopia, chemiluminiscencia a pod [86, 87].

Elektrochemickú detekciu (ECD) využívajú mikrofluidné zariadenia, ktoré sú kompaktné a plne integrované, pretože analytický signál je detekovaný systémom elektród, ktoré sú prirodzene malé a kompaktné. Častejšie sa využíva ampérometria než potenciometria [86].

Integrovanie hmotnostnej spektrometrie s mikrofluidikou je výzvou hlavne v posledných rokoch, pretože vysoká účinnosť MS v analýze analytov za nízkych koncentrácií sa vhodne dopĺňa s možnosťou analýzy malých objemov a účinnosťou separácie, ktoré sú typické pre mikrofluidiku. Typické hodnoty toku v mikrofluidike sú vhodné pre MS s ionizáciou elektrosprejom (ESI-MS). Integrácia ionizačného procesu do mikrofluidného zariadenia je veľkou výzvou [86].

1.11.3 Zhodnotenie mikrofluidných techník

Mikrofluidné techniky majú určite svoje miesto v analytických metódach, o čom svedčí veľké množstvo publikovaných informácií na danú tému [88-91]. Avšak problémom je niekedy nedostatočné vysvetlenie samotného princípu separácie pre koncových užívateľov. Samozrejme výhody sú tiež zreteľné, dôležitá je úspora času, čím sú mikrofluidné techniky výhodné v diagnostike, avšak v mnohých iných odvetviach zatiaľ nie je ich použitie časté. Na analýzu proteómu sa stále využíva viac klasická 2D elektroforéza a mikrofluidné techniky sú chápané ako rozkladná metóda, ktorá sa snaží nahradiť všetky klasické analytické postupy. Výhodou však stále ostáva použitie mikrofluidiky v prípade limitovaných objemov vzorky alebo pri nutnosti analýzy v čo najkratší čas [92].

1.12 Proteomika a životné prostredie

Proteomická analýza so zameraním na životné prostredie rieši prevažne otázky vplyvu polutantov a cudzích látok na mikroorganizmy a organizmy. Avšak dôležitou oblasťou je tiež

skúmanie látok, ktoré na prvý pohľad pre organizmus nie sú nebezpečné, avšak pri výskyte v nadlimitných koncentráciách môžu organizmus nenávratne poškodiť, či spôsobiť jeho smrť.

Posledné roky bola proteomika aplikovaná na organizmy z ekosystémov s rôznym stupňom znečistenia, čím sa vytvoril základ pre environmentálnu odnož proteomiky. Životné prostredie obsahuje množstvo kontaminantov, z nich takmer 100 000 je uvoľňovaných v množstvách, ktoré dokážu ovplyvniť ekosystém. Mnohé z nich sú organické zlúčeniny ako ropné deriváty a polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, dibenzofurány, či pesticídy. Na ekosystémy tiež vplývajú metaloidy, nitroamíny, chinóny a iné elektrofilý. Niektoré polutanty indukujú v organizmoch oxidačný stres [93]. Baktérie, kvasinky a huby sú ako prvé v ekosystéme ovplyvnené organickými polutantmi a ťažkými kovmi. Mikroby majú kľúčovú rolu v biotransformácii, bioakumulácii a iných environmentálne relevantných procesoch [94].

Porovnanie proteínov vznikajúcich za stresových podmienok s kontrolou umožňuje detekciu špecifických zmien v proteóme. Identifikácia proteínov, ktoré sú indukované alebo potlačené umožňuje vysvetlenie molekulových mechanizmov stresovej odozvy. Tento postup predstavuje nový prístup v molekulárnej biológii. Skôr než o cieľené pomenovanie konkrétnych proteínových skupín ide aktuálne o zabezpečenie kvalitatívneho aj kvantitatívneho pohľadu na celý proteóm, ktorý je dôležitý pre život a funkcie organizmu. Kombináciou s genomickými a metabolomickými dátami podáva znalosť proteínov pravdivý obraz o fungovaní životného cyklu [95, 96]. Vo všeobecnosti ponúka proteomika v analýze životného prostredia niekoľko výhod, ako je napríklad rýchlejší screening toxických vplyvov a možnosť detekovať toxické efekty vo významne nižších dávkach za použitia citlivých analytických techník [97].

Organizmy vystavené vplyvu polutantov vykazujú odozvy, napríklad formou indukcie biotransformujúcich enzýmov. Tie, ktoré patria k fáze I ako napr. cytochrómy P450, pridávajú polárnu skupinu materskej zlúčenine. Enzýmy fázy II konjugujú ich produkty na endogénne metabolity. Iné inducibilné enzýmy, ako napríklad HSP a metalothioníny opäť zviňajú denaturované proteíny alebo chránia organizmus pred toxicitou kovmi. Primárne antioxidačné enzýmy ako napríklad superoxiddismutáza či glutathionperoxidáza, sekundárne a antioxidačné enzýmy ako thioredoxíny či glutaredoxíny sú indukované po vystavení vplyvu polutantov [93].

Mnohé reakcie vyvolané polutantmi sú používané ako biomarkery, hoci ich použitie vyžaduje hlbšiu znalosť ich toxického mechanizmu a tieto biomarkery sú len čiastočne aplikovateľné. Aj keď sa zameriavajú na známe proteíny, vylučujú z analýzy zároveň tie, ktoré môžu byť zmenené, hoci ich vzťah k znečisteniu je neznámy. Posledné vyvinuté proteomické techniky môžu identifikovať proteíny ktoré sú jasne zmenené po vystavení pôsobeniu polutantov a po validácii môžu slúžiť ako nové biomarkery. Problémom je doteraz nezmapovaný genóm väčšiny organizmov, čo robí následne problémy pri identifikácii proteínov pomocou MALDI-TOF [93].

1.13 Metabolomická stresová analýza

Úloha metabolitov v bunke je veľmi dôležitá. Sú prostredníkom biochemických reakcií a spájajú množstvo rôznych metabolických dráh, ktoré fungujú v bunke. Metabolity dokážu poskytnúť informáciu o funkcii bunky a tak definovať fenotyp bunky alebo tkaniva ako reakciu na genetické alebo environmentálne zmeny. Analýza funkcií bunky na molekulovej úrovni si vyžaduje rôzne analytické techniky. Zatiaľ čo komplexné metódy pre analýzu na translačnej

úrovni (skúmanie proteómu) sú v prudkom štádiu vývoja a používania, metódy pre analýzu metabolómu sú menej bežné a v podstate neexistuje jediná metóda pre analýzu kompletného metabolómu. Hoci čiastkovo sa metódy analýzy metabolitov používajú, je snaha o vyvinutie metód pre analýzu veľkého počtu intracelulárnych metabolitov v kontexte funkčnej genomiky. Analýza metabolómu zahŕňa indentifikáciu a kvantifikáciu všetkých intracelulárnych a extracelulárnych metabolitov s molekulovou hmotnosťou menšou než 1000 Da, využívajúc pritom rôzne analytické techniky. Vo všeobecnosti, úroveň každého metabolitu závisí na fyziologickom, vývojovom a patologickom stave bunky, tkaniva či organizmu. Problémom však je neschopnosť zaviesť priame spojenie medzi génmi a metabolitmi. Spletitý charakter bunkového metabolizmu, kde jeden metabolit sa môže účastniť v mnohých rôznych metabolických dráhach, komplikuje interpretáciu metabolických dát [98].

Interpretácie genómu, transkriptómu a proteómu je založená na cielenej chemickej analýze biopolymérov (4 nukleotidy pre genóm a transkriptóm, 22 aminokyselín pre proteóm). Problém u metabolómu je ten, že existuje široké spektrum chemických štruktúr – metabolóm tvoria látky od anorganických iónov až po hydrofilné sacharidy, prchavé alkoholy a ketóny, aminozvyšky organických látok, hydrofóbne lipidy a iné komplexné prírodné látky [98].

Sú dva pojmy, ktoré sa používajú pre analýzu časti metabolómu – profilovanie metabolitov („metabolite profiling“) a metabolická identifikácia („metabolic fingerprinting“). Profilovanie metabolitov je pomenovanie pre analýzu daného setu metabolitov (aminokyseliny, organické kyseliny), zatiaľ čo metabolická identifikácia je nešpecifická analýza vzorky (napr. píky po hmotnostnej spektrometrii). Najčastejšie využívanými metódami detekcie metabolómu je hmotnostná spektrometria (MS) a nukleárna magnetická rezonancia (NMR) [98].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom dizertačnej práce bolo štúdium vplyvu rôznych typov stresových podmienok na vybrane organismy – mikrobiálne a rastlinné so zameraním na analýzu niektorých proteínov, celého proteómu a vybraných sekundárnych metabolitov. Hlavná pozornosť bola venovaná enzýmom a metabolitom zapojeným v antioxidačnej odozve. Jednotlivé dielčie úlohy boli riešené s využitím najmodernejších dostupných metód a prístrojov.

- Prevedenie kultivačných techník na rôznych druhoch kvasinkových mikroorganizmov
- Využitie regulácie produkcie biomasy a tvorby stresových metabolitov u kvasinkových mikroorganizmov
- Zavedenie postupov šetrnej dezintegrácie buniek karotenoidných a iných druhov kvasiniek, optimalizácia izolačných postupov proteínov z rôznych biologických materiálov
- Optimalizácia 1D, 2D a mikrofluidnej separácie pri delení proteínových vzoriek; pokus o identifikáciu hlavných proteínov exprimovaných v strese pomocou metód hmotnostnej spektrometrie
- Využitie zavedených metód k analýze vybraných metabolitov vystavených podmienkam exogénneho stresu
- Zrovnávacia štúdia vplyvu exogénnych stresových faktorov na vybrané druhy priemyslových kvasinkových mikroorganizmov produkujúcich významné sekundárne metabolity
- Analýza enzýmových aktivít a antioxidačnej charakteristík vo vybraných typoch technologicky významného rastlinného materiálu – v jablkách, jačmeňoch a sladoch

4 MATERIÁL A METODICKÉ POSTUPY

4.1 Mikrobiálne kmene, materiál, chemikálie a prístrojové vybavenie

4.1.1 Kvasinkové kmene

V práci boli využité nasledovné kmene kvasiniek, ktoré boli získané na základe spolupráce so SAV Bratislava.

- *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26 a CCY 20-2-33
- *Rhodotorula rubra (mucilaginosa)* CCY 20-7-28 a CCY 20-7-31
- *Rhodotorula aurantiaca* CCY 20-9-7
- *Sporobolomyces salmonicolor* CCY 19-4-8 a CCY 19-4-6
- *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4
- *Sporobolomyces shibatanus* CCY 19-20-3
- *Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1 a CCY 10-1-2
- *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-88 (porovnávací kmeň)

4.1.2 Rastlinný materiál

4.1.2.1 Jablká

Na analýzu proteínov z jablák boli testované jablká zakúpené v bežnej obchodnej sieti (odrody Jonagold, Topaz, Gloster, Melinda, Sudtirol, Šampión). Pre analýzu antioxidantných enzýmov boli použité tri odrody jablák – Idared, Golden Delicious a Jonagored. Vzorky pre analýzu antioxidantných enzýmov a ostatných antioxidantných látok sa líšili formou skladovania – časť bola skladovaná v normálnej atmosfére, časť v modifikovanej atmosfére so zníženou koncentráciou kyslíku (2%).

4.1.2.2 Jačmene a slady

Pre enzýmovú analýzu a celkovú antioxidantnú aktivitu jačmeňov a sladov boli použité nasledovné vzorky.

Tab. 9 Zoznam použitých jačmeňov a sladov (dodané z VÚPS)

označenie vzoriek	označenie AZL Brno	Odroda	označenie vzoriek	označenie AZL Brno	Odroda
1	1297	Wikingett	11	1307	Marthe
2	1298	Troon	12	1308	Maltasia
3	1299	Cruiser	13	1309	Lissane
4	1300	Bellevue	14	1310	Musikant
5	1301	Biatlon	15	1311	Xanadu

6	1302	Mauritia	16	1312	Jersey
7	1303	Ebson	17	1313	Malvaz
8	1304	NFC Tipple	18	1314	Binder
9	1305	Westminster	19	1315	Tepelský
10	1306	Publican	20	1316	Ratbořský

4.1.3 Chemikálie

4.1.3.1 Štandardy

proteínová zmes 4 (frakcie: 97; 67; 45; 29 kDa, Serva SRN); proteínová zmes 5 (frakcie: 29; 21; 12,5; 6,5 kDa, Serva SRN), proteínová zmes 6 (frakcie: 97; 67; 45; 29; 21; 12,5; 6,5 kDa, Serva SRN), Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad (USA), Protein Broad Range, Bio-Rad (USA), β -karotén (β , β -karotén), Sigma (SRN), lykopén, Sigma (SRN), lutein (α -karotén-3,3'-diol), Sigma (SRN), lipoxigenáza, Sigma (SRN)

4.1.3.2 Špeciálne chemikálie – analýza bielkovín

Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Serva (SRN); Ethylendiamintetraoctová kyselina, β -Mercaptoethanol, Serva (SRN); Bromphenol Blue, Serva (SRN); Sodium dodecylsulfate, Serva (SRN); Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), Sigma (SRN); Fenolové činidlo (Folin-Ciocalteu), J. Kulich (ČR); Acrylamide, Serva (SRN); N,N-methylen-bis-acrylamide, Serva (SRN); Ammonium persulfate, Serva (SRN); N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), Sigma (SRN), Commassie Blue R-250, Serva (SRN);

4.1.3.3 Chemikálie na analýzu enzýmov

Peroxid vodíku, Sigma (SRN), Polyvinylpyrrolidon, Sigma (SRN), Ransod kit, Randox Laboratories (USA), Total antioxidant status kit, Randox Laboratories (USA), Triton X-100, Serva (SRN), 4-methylcatechol, Sigma (SRN), kyselina linolová, Sigma (SRN)

4.1.3.4 Rozpúšťadlá HPLC

Methanol pro HPLC, Riedel-de-Häen (SRN); Acetonitril pro HPLC, Riedel-de-Häen (SRN); Ethanol UV p.a., Lachema (ČR), Aceton p.a., Lachema (ČR)

4.1.3.5 Kultivačné médiá

Yeast Autolysate, Himedia (India); Agar, Himedia (India);

Ostatné bežné chemikálie boli štandardnej čistoty p.a.

4.1.4 Použité prístroje a pomôcky

4.1.4.1 Zostavy pre elektroforézu bielkovín a western blot

- Elektroforetická aparátúra P9DS, Owl Separation Systems (USA)
- Elektroforetický zdroj EHC 250-90 (USA)
- Zdroj napätia pre elektroforézu, Series 90, Mid Range Power Supplies E-C Apparatus Corporation (USA)
- Automatická elektroforetická stanica Experion, Bio-Rad (USA)
- Experion priming station, Bio-Rad (USA)
- Electronic Dualware Transilluminator UltraLum, Inc. (USA)
- Ultra Viewer, UltraLum, Inc. (USA)
- Camera Harrison 52 mm, Srew-In (USA)
- Epson Digital Camera, Seiko Epson Corp. (Japan)
- Protean IEF Cell, Bio-Rad (USA)
- Mini-PROTEAN Cell, Bio-Rad (USA)
- PROTEAN Plus Dodeca Cell, Bio-Rad (USA)
- Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad (USA)

4.1.4.2 Zostava pre HPLC a MS

- Zostava HPLC, ECOM (ČR) - programátor gradientu GP 5
 - vysokotlaké čerpadlo P 4020
 - trojcestný dávkovací ventil D
 - termostat kolóny LCO 101
 - UV-VIS detektor procesorový LCD 2084
 - integrátor Data Apex CSW v. 1,7
 - kolona Supelco (4,6x150 mm): reverzná fáza C18 (5 µm), Labicom s.r.o. (ČR)
 - predkolóna Supelco (4,6x30 mm): C18 (5 µm), Labicom s.r.o. (ČR)
- HPLC/PDA/ESI-MS - čerpadlo Gradient Surveyor MS Plus, Thermo Finnigan (USA)
 - detektor Photo Diode Array PDA Surveyor Plus, Thermo Finnigan (USA)
 - trojcestný dávkovací ventil D, ECOM (ČR)
 - termostat kolóny LCO 101, ECOM (ČR)
 - vákuová pumpa, Thermo Finnigan (USA)
 - MS detektor LCQ Advantage Max, Thermo Finnigan (USA)
 - LS-MA SW Xcalibur 1.3., Thermo Finnigan (USA)
- hmotnostný spektrometer Esquire 2000, Bruker Daltonics (USA)
- zostava LC-MS/MS - gradientová pumpa (Ultimate, LC Packings)
 - automatický dávkovací (Famos, LC Packings)
 - prepínací modul (Switchos, LC Packings, Holandsko)

- HCTultra PTM Discovery System hmotnostný spektrometer
(Bruker Daltonik)

4.1.4.3 Ostatné prístroje

- Spektrofotometer VIS Helios δ , Unicam (UK)
- Spektrofotometer UV-VIS Helios α , Unicam (UK)
- trepačka LT 2, Sklářny Kavalier n.p. (ČR)
- trepačka, Yellow line RS/OS 10 basic, IKA[®]-Werke GmbH&Co. KG (SRN)
- Trepačka/inkubátor Heidolph Instruments Promax 1020 (SRN)
- vákuová odparka RVO6-ML, IKA[®]-Werke GmbH&Co. KG (SRN)
- mikrocetrifúga Cu-C, Sunon (Taiwan)
- centrifúga 3-15, Sigma (SRN)
- (mikro)centrifúga chlazená U-32R, Boeco (SRN)
- analytické váhy, Boeco (SRN)
- predvážky, Ohaus LS 2000 (SRN)
- laminární box Aura Mini, Bio Air Instruments (USA)
- lyofilizátor a CentriVap Concentrator, Labonco (UK)
- pH-meter HI 9321, HANNA Instruments (Taliansko)
- mikroskop, LII00a (SRN)
- termostat OP 30-U, Biotech (Sweden)
- Ultrasonic compact cleaner, Powersonic (SR)
- jednorázové membránové filtre PRE – CUT membranes 0,2 μ m nylon 13 mm 100/PK, Alltech (USA)
- bežné laboratórne sklo

4.2 Produkcia mikrobiálnej biomasy

4.2.1 Kultivačné podmienky

4.2.1.1 Kultivácia kvasinkových kmeňov

Všetky kmene (*Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces shibatanus*, *Cystofilobasidium capitatum*) boli kultivované za rovnakých podmienok, aby bolo možné porovnanie produkcií jednotlivých kmeňov medzi sebou. V rámci kultivácie boli testované rôzne kultivačné médiá (základné a bohaté). Postup kultivácie bol dve inokulačné médiá (2x24 hod) a jedno produkčné (80 hod). Ako inokulačné médium sa používalo médium bez prídavku kvasničného autolýzáta, produkčné médium bolo namiešané podľa Tab. 10 a

Tab. 11. Médiá boli sterilizované a následne pripravené na použitie. Použité kmene patria medzi mezofilné a aeróbne mikroorganizmy, takže kultivácia prebiehala pri 28°C za stáleho trepania (90 min⁻¹). V priebehu celej kultivácie bolo stále osvetlenie, ktoré aktivovalo tvorbu karotenoidov.

Tab. 10 kultivačné médium základné

Zložka	Inokulum	Produkcia
Glukóza	40 g	40 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g	5 g
MgSO ₄	0,34 g	0,34 g
kvasničný autolyzát	7 g	-
Voda	1000 ml	1000 ml

Tab. 11 kultivačné médium bohaté

Zložka	Množstvo
Kvasničný autolyzát	5 g
Glukóza	40 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄	0,5 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
Mikroelementový roztok	0,25 ml
Destilovaná voda	1 000 ml

Tab. 12 Zloženie mikroelementového roztoku

zložka	H ₃ BO ₃	CuSO ₄ ·5H ₂ O	KI	MnSO ₄	FeCl ₃ ·6H ₂ O	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
Množstvo (g/l)	1,25	0,1	0,25	1	0,5	0,5	1

4.2.1.2 Kultivácia v prítomnosti stresových faktorov

Všetky uvedené kmene kvasiniek boli vystavené pri kultivácii rôznym druhom exogénneho stresu. Najčastejšie bol použitý chemický stres vo forme prídavku NaCl a H₂O₂ do produkčného média. Táto forma stresových faktorov bola použitá na základe našich predchádzajúcich štúdií [99-101].

K indukcií oxidačného stresu boli použité dve koncentrácie H₂O₂ (2 mmol/l a 5 mmol/l), ako osmotický stres boli aplikované dve koncentrácie NaCl (2% a 5%). U každej kultivácie bol stanovovaný zákal kvasinkovej suspenzie turbidimetricky (630 nm) a tiež bola pod mikroskopom pozorovaná morfológia buniek a čistota mikrobiálnej kultúry.

4.2.1.3 Kultivácia porovnávacích kmeňov

Ako porovnávací kmeň pri izolácii bielkovín slúžila kultúra kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, na ktorej kultiváciu sa používalo klasické YPD médium (Tab.13). Kultivovalo sa systémom 2x inokulum po 24 hod a 1x produkčné médium, tiež 24 hod, bez trepania a bez pomocného svetelného zdroja.

Tab. 13 YPD médium

Zložka	Množstvo
Bakteriologický pepton	20 g
Kvasničný autolýzát	10 g
Glukóza	20 g
Voda	1000 ml

4.2.1.4 Spracovanie biomasy

Celý objem produkčného média (obvykle 300 ml) bolo zcentrifugovaných pri 5000 otáčkach po dobu 10 min. Bunky boli potom premyté a opäť stočené. Takto zozbierané bunky boli buď hneď použité na analýzu (karotenoidy), alebo uchované vo fyziologickom roztoku pri -20°C k ďalším analýzám. Časť biomasy bola spracovaná lyofilizáciou, keď nakultivované a premyté bunky boli zmrazené v malom množstve destilovanej vody a následne lyofilizované. Pre ďalšie analýzy boli bunky uchovávané pri -20°C.

4.2.2 Dlhodobé uchovávanie mikroorganizmov

Kvasinkové kultúry boli uchovávané na sterilných šikmých agaroch, kde médium tvorila sladina, v tme, pri 4°C. Približne raz za dva týždne boli kmene preočkované na novú sériu agarov.

4.2.3 Test životnosti kvasiniek

Test prebehol na kultúrach karotogénnych kvasiniek, ktoré boli po bežnej kultivácii ošetrené lyofilizáciou. Vysušené bunky boli po určitej dobe pridané do živného média a bolo pozorované, či dôjde k rastu kultúry.

4.3 Metódy použité k izolácii proteínov z komplexných vzoriek

4.3.1 Kvasinky

4.3.1.1 Optimalizácia izolačných techník

Prvé optimalizačné kroky boli prevedené na kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*. Približne 0,3 g vlhkej váhy buniek bolo podrobených lýze so zameraním sa na použitie SDS a sklenených guľičiek o priemere 160 µm [102].

Tab. 14 Optimalizačné metódy na kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*

1.	0,3 g buniek + vzorkový pufer → vortex → var 5 min
2.	0,3 g buniek + 1 ml 10% SDS → vortex → + vzorkový pufer → vortex → var 5 min
3.	0,3 g buniek + 2 špachtle guľôčiek → vortex → + vzorkový pufer → vortex → var 5 min [102]

Takto pripravené vzorky boli nanesené na PAGE gél. Pred nanesením bola skontrolovaná dezintegrácia buniek pod mikroskopom.

V ďalších krokoch optimalizácie boli postupy, popísané v Tab. 14, aplikované aj na červené kmene kvasiniek, pričom mokrá váha použitých buniek bola cca 0,5 g. Všetky izolačné postupy boli prevedené za chladu.

Pri skúšaní vhodnej izolačnej techniky proteínov z červených kvasiniek bol aplikovaný aj postup s NaOH [103]. Podrobný postup je popísaný v kap. 4.3.1.2. V rámci optimalizácie boli otestované rôzne koncentrácie použitého NaOH v rozmedzí 0,2 – 0,4 M. Tiež bolo testované súčinné pôsobenie NaOH, SDS a guľôčok, v rôznych dávkovaniach, ale tieto postupy sa nakoniec tiež neukázali ako vhodné pre ďalšie analýzy.

Počas určitých pokusov boli použité aj inhibítory proteáz (PMSF), ale ich použitie pri izolácii proteínov na PAGE-SDS sa nepreukázalo ako podstatné. Pri príprave vzoriek na 2D elektroforézu už boli inhibítory proteáz používané, postup je popísaný v kap. 4.4.6.1.

Pri vybraných experimentoch bola testovaná aj extrakcia proteínov z lyofilizovaných kvasinkových buniek pre následnú analýzu 1D elektroforézou, pretože bunky v tejto forme sa ukázali ako vhodné k príprave vzoriek pre 2D analýzy. Tento spôsob predprípravy materiálu sa však pre 1D analýzy neosvedčil.

V rámci optimalizačných meraní boli vzorky po izolačných technikách delené na dva druhy. Keďže v laboratóriu nie je ultracentrifúga, boli preto skúmané obsahy proteínov aj v supernatantoch, aj v sedimentoch. To znamená, že vzorka po izolácii bola stočená na maximálnych možných otáčkach (8000 ot.), a potom bola rozdelená na supernatant a sediment, supernatant bol zahustený na vákuovej odparke, a potom bol k takto pripraveným vzorkam a aj ku sedimentom pridaný vzorkový pufer a povarené vzorky boli nanášané na PAGE gél. Tiež bolo aplikované vyzrážanie proteínov zo zmesí organickými rozpúšťadlami, najčastejšie acetónom, avšak účinnosť a schopnosť zrážania nebola dostatočná, a tak tento postup nebol ďalej aplikovaný.

Bola tiež použitá izolácia proteínov vo forme tzv. extraktu celkových proteínov získaného precipitáciou pomocou kyseliny trichlóroctovej (TCA), ale len pre izoláciu proteínov z kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*. Hoci je táto metóda bežne aplikovaná pre získanie celkového proteínového extraktu, na červené kvasinky sa ukázala ako nedostatočne účinná.

Po sérii optimalizačných krokov boli na základe prevedených testov vybraté nakoniec dva izolačné postupy (s použitím NaOH a SDS), ktoré boli potom aplikované na všetky kvasinkové kmene.

4.3.1.2 Izolácia proteínov pomocou NaOH

K cca 0,5 g vlhkej váhy buniek bol pridaný 1 ml 0,2 mol/l NaOH a cca 2 – 3 špachtle sklenených guľôčok o priemere 160 µm, čo zodpovedá veľkosti kvasinkových buniek. Po

premiešani na vortexe bola zmes nechaná inkubovať 10 min pri laboratórnej teplote. Po tejto dobe bola zmes opäť dôkladne premiešaná a následne centrifugovaná (6000 otáčok, 10 min). Supernatant bol odstránený a ku sedimentu bol pridaný vzorkový pufer. Po premiešaní a povarení vzoriek so vzorkovým pufrom (3 – 5 min) boli vzorky pripravené k analýze, prípadne uschované pri -20°C [103].

4.3.1.3 Izolácia proteínov pomocou SDS

Všetky kroky pri izolácii pomocou SDS boli prevedené za chladu. K cca 0,5 g vlhkej váhy buniek bol pridaný 1 ml 10% SDS a cca 2 – 3 špachtle sklenených guľôčok, rovnako ako pri izolácii s NaOH. Následne bola zmes miešaná v pomere 1 – 2 min vortex/5 min inkubácia v chlade. Tento postup bol opakovaný 4krát. Potom bol k celému objemu pridaný vzorkový pufer, zmes bola opäť premiešaná a povarená. Takto pripravené vzorky boli následne analyzované alebo uchované pri -20°C.

4.3.1.4 Izolácia proteínov pomocou TCA

K cca 0,5 g vlhkej váhy premytých buniek bolo pridaných 300 µl 20% TCA. Následne boli pridané sklenené guľôčky a zmes bola vortexovaná 10 minút. Suspenzia bola prenesená do inej ependorfky, a potom bola centrifugovaná na maximálnu rýchlosť (10 000 ot., 1 min). Po centrifugácii ostali na dne skúmavky usadené proteíny, ktoré boli po vyliatí supernatantu ďalej štandardne upravené so vzorkovým pufrom a po vare boli uchované k ďalšej analýze.

4.3.1.5 Príprava vzoriek proteínov z kvasiniek pre analýzu pomocou mikročipovej elektroforézy

Postup prípravy vzorky tesne pred vlastnou analýzou je popísaný ďalej. Samotné proteíny boli z kvasiniek izolované rovnakými postupmi ako bunky na analýzu 1D elektroforézou (kap. 4.3.1.2, 4.3.1.3), až po krok pridania vzorkového pufru, kde namiesto neho bolo pokračované v postupe popísanom v kap. 4.4.5.2.

4.3.2 Jablká

4.3.2.1 Príprava vzoriek pre analýzu proteínov

Zvážené jablká boli zbavené jadier a dezintegrované spoločne so šupkou. Dezintegrácia prebiehala za chladu. Rozomleté jablká boli pretlačené cez gázu a šťava bola centrifugovaná v chladenej centrifúge pri 4°C a 10 000 ot/min po dobu 5 min. K sedimentu bol pridaný vzorkový pufer a po povarení boli vzorky pripravené na naniesenie. Supernatant bol zahustený na vákuovej odparke a potom bol postup rovnaký ako pri sedimente. Bol testovaný aj postup za použitia prídavku 10% SDS v dezintegračnom kroku. Ďalej boli vzorky upravované rovnako ako v predchádzajúcom prípade.

4.3.2.2 *Príprava vzoriek pre analýzu antioxidantných enzýmov*

Keďže sledované antioxidantné enzýmy rýchlo reagujú so vzdušným kyslíkom, pričom prechádzajú do oxidovanej formy, úprava vzorky musela byť maximálne šetrná a zaisťujúca čo najväčšie množstvo uchovaných aktívnych enzýmov. Na základe toho bolo vyskúšaných viacero postupov úpravy vzorky.

Celé jablko bolo zvážené, rozpolené a na analýzu antioxidantných enzýmov bola použitá jedna polovica. Potom boli aplikované štyri postupy spracovania jabĺk (Tab. 15), ktorými bol optimalizovaný proces izolácie. Jablko bolo vždy nastrúhané na plastovom strúhadle (zabránenie oxidácie vzorky).

Tab. 15 Izolačné postupy pre antioxidantné enzýmy z jabĺk

Postup 1	Po nastrúhaní sa vytlačená šťava nechala urýchlene zamraziť. Potom bola vzorka lyofilizovaná a následne podrobená analýze.
Postup 2	Spracovanie ako v postupe 1, avšak pred vytlačením šťavy prídavok 2 g polyvinylpyrolidonu a 1 ml Tritonu X-100 [104].
Postup 3	Po nastrúhaní bola zmes postupne zmrazovaná tekutým dusíkom (0,5 l dusíka na vzorku). Potom bola zmes urýchlene rozomletá na prášok. Takto pripravená vzorka sa následne analyzovala.
Postup 4	Spracovanie ako v postupe 3, ale s prídavkom 2 g polyvinylpyrolidonu a 1 ml Tritonu X-100 do zmesi [104].

Po takomto spracovaní materiálu boli vzorky uchovávané v mrazničke pri teplote -18°C .

4.3.3 **Jačmeň a slad**

Na analýzu enzýmov v jačmeni a v slade boli navážené vzorky (5 g) rozomleté a následne extrahované v 25 ml acetátového pufru (0,1M octan sodný, pH 5,0) 1 hod za chladu a za neustáleho trepania. Po extrakcii boli vzorky centrifugované a zozbieraný supernatant bol následne analyzovaný.

4.4 **Analýza intracelulárnych bielkovín**

4.4.1 **Hartree-Lowryho metóda stanovenia celkových proteínov**

Stanovenie koncentrácie Lowryho metódou je kolorimetrické, založené na dvojzložkovom činidle. Prvou zložkou je biuretové činidlo, druhou je Folinovo činidlo. Princíp metódy spočíva v reakcii dusíkov peptidovej väzby s meďnatým iónom v alkalickom prostredí a následnej redukci fosfomolybdenanov hydroxyfenolovou skupinou tyrozínu na molybdenovú modrú. Metóda teda využíva ku stanoveniu bielkovín v nich viazaného tyrozínu, tryptofánu a cysteínu a ich reakcie s Folinovým-Ciocaltenovým činidlom. Ako kalibračný štandard sa najčastejšie používa hovädzí albumín. Metóda je citlivá na zmeny pH a preto pH stanovovanej zlúčeniny by malo byť okolo 10 – 10,5 [105].

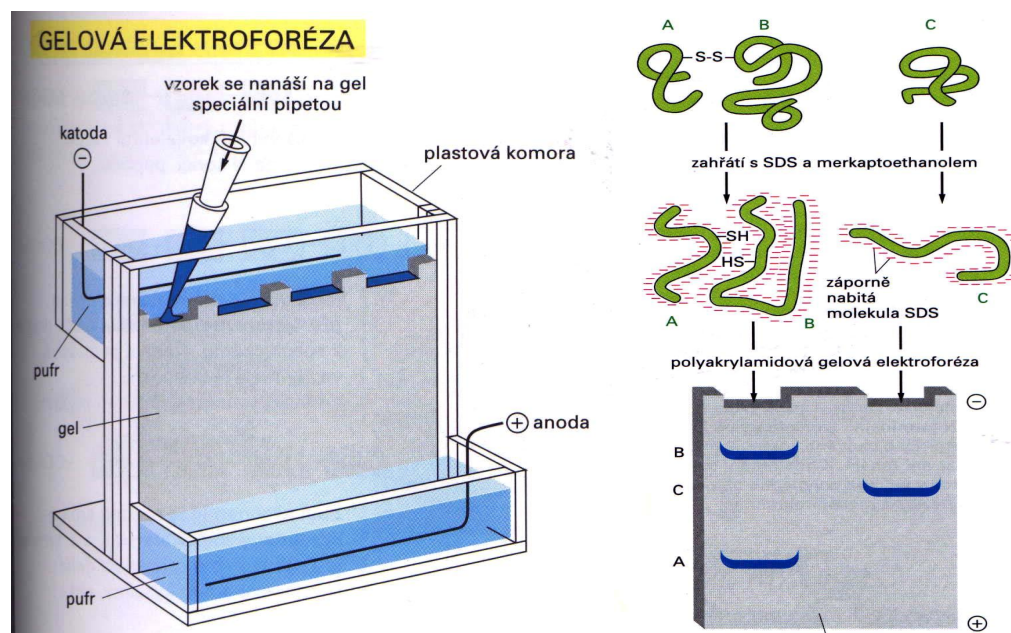
Celkový obsah proteínov sa stanovoval vo vzorkách jabĺk uchovávaných v rôznych typoch atmosféry. 0,1 g jablka zmrazeného v tekutom dusíku bolo rozpustených v 10 ml fosfátového pufru (0,1M; zmes $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a KH_2PO_4). Následne boli vzorky odstredené pri 7500 ot/min po dobu 10 min. Na stanovenie bol použitý len supernatant, takže boli stanovené len rozpustné proteíny.

4.4.2 Bradfordova metóda stanovenia celkových proteínov

Bradfordova metóda je jednoduchá metóda pre stanovenie koncentrácie proteínu a je jednou z najpoužívanejších. Pre meranie je dôležitá rýchlosť a presnosť. V porovnaní s Lowryho metódou je Bradfordova metóda citlivejšia a interferuje tu menej reagentov. Princíp spočíva v naviazaní farbiva Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteín. Meria sa absorbancia pri 595 nm. Farbivo sa ľahko viaže na arginínové a lysínové zvyšky [65]. Celá metóda sa prevádzala v mikromerítke. Bolo pipetovaných medzi 10 a 100 μg proteínu v 100 μl celkového objemu. Koncentrácia bola vypočítaná pomocou kalibračnej krivky. Výsledok bol získaný do 5 min.

4.4.3 Elektroforéza intracelulárnych bielkovín pomocou 1D PAGE-SDS

K separácii bielkovín bola použitá elektroforetická aparátúra P9DS (16 cm x 14 cm, hrúbka gélu 1,5 mm) zložená z elektroforetickej vane Shelton a elektroforetického zdroja EHC 250-90, SH 300. Nosičom bol polyakrylamidový gél v deliacom pufré. Zviditeľnenie oddelených bielkovín umožnilo farbenie. Ako elektrolyt bol používaný 0,025 mol/l Tris-glycínový pufer s prídavkom SDS.



Obr. 16 Elektroforéza bielkovín v polyakrylamidovom géle v prítomnosti SDS [21]

4.4.2.1. Roztoky

Použité roztoky na prípravu gélov udáva Tab. 16

Tab. 16 Roztoky používané na prípravu polyakrylamidových gélov

Zásobný roztok	AA:BIS [(40% AA) : (3,3% BIS) = 29 : 1]
Separčný pufer	1,5 mol/l Tris-HCl pH 8,8
Koncentračný pufer	0,5 mol/l Tris-HCl pH 6,8
Elektrodový pufer	0,025 mol/l Tris/glycín-SDS
Vzorkovací pufer	2,13 ml 0,5 mol/l Tris-HCl pH 6,8; 1 g SDS; 5 ml glycerolu; 2,5 ml β -merkaptoethanolu, 1 mg bromfenolovej modrej (doplniť na 10 ml redestilovanou vodou)
Iniciačné činidlo	25% APS v redestilovanej vode (pripravovať vždy čerstvý)

4.4.2.2. Príprava polyakrylamidového gélu

Pipetované objemy na prípravu polyakrylamidového gélu záviseli na želanej hustote a zosieťovaní gélu (Tab. 17). Vždy bol najskôr pripravený separčný gél, ktorý vznikol zmiešaním AA:BIS so separčným pufrom a redestilovanou vodou. Táto zmes bola následne sonifikovaná minimálne 3 minúty. Potom boli pridané SDS a TEMED. Polymerácia gélu bola zahájená prídavkom APS. Po opatrnom zamiešaní bola zmes urýchlene naliata do priestoru medzi dvoma sklami v nalievacom stojane. Gél bol prevrstvený destilovanou vodou.

Následne bol pripravený koncentračný gél, ktorý umožňuje fokusáciu bielkovín do ostrých zón. AA : BIS bolo zmiešané s koncentračným pufrom a redestilovanou vodou. Zmes bola opäť krátko sonifikovaná. Opäť boli pridané roztoky SDS, TEMED a APS. Po stuhnutí polyakrylamidového gélu (cca 30 minút) bola destilovaná voda z povrchu gélu odsatá filtračným papierom a bol doliaty koncentračný gél, do ktorého bol vložený nanášací hrebeň slúžiaci k vytvoreniu jamiek pre vzorky.

Tab. 17: Pipetované objemy roztokov na jednotlivé druhy aparatúr

druh aparatúry	P9DS, 10% gél	P9DS, 12,5% gél	zaostr. gél P9DS
roztoky			
AA/BIS	10	12,5	1,25
Tris/HCl pH 8,8	10	10	-
Tris/HCl pH 6,8	-	-	2,5
redest. H ₂ O	19,6	17,1	6,15
SDS	0,4	0,4	0,1
TEMED	0,06	0,06	0,045
APS	0,24	0,24	0,12
Σ	40 ml	40 ml	10 ml

4.4.2.3.Príprava vzoriek

Jednotlivé vzorky bielkovín boli podľa potreby zahustené a zakoncentrované na vákuovom evaporátore (Labconco, USA), zmiešané so vzorkovacím pufrom v pomere 1 : 1 a potom povarené vo vodnom kúpeli 3 minúty.

4.4.2.4.Prevedenie vertikálnej elektroforézy

Sklenené dosky s gélom boli prenesené do vertikálnej elektroforetickej aparatury Shelton, upevnené šróbami a do elektródového priestoru bol naliaty elektródový pufer. Po odstránení hrebeňa bolo do jamiek nanášaných 10 - 25 μ l vzorky, podľa obsahu proteínov vo vzorke.

Elektródová nádoba bola uzavretá a pripojená ku zdroju (Obr. 17). Voľba prúdu a napätia závisela od vyizolovaných proteínov. Akonáhle zóna brómfenolovej modrej doputovala na úroveň dolného okraja skla, bol zdroj napätia vypnutý. Gél bol opatrne uvoľnený zo sklenených dosiek a nafarbený.



Obr. 17: Aparatúra P9DS pre PAGE-SDS

4.4.2.5.Farbenie

Detekcia bielkovín pomocou Coomassie Brilliant Blue R-250

Po dokončení elektroforézy bol gél prenesený do premývacej nádoby s 96% ethanolom, čím došlo k zafixovaniu proteínov. Po opláchnutí destilovanou vodou bol gél ponorený na 5 minút do farbiacej nádoby s Coomassie Brilliant Blue R-250 (CCB, methanol, kyselina octová, voda – 0,25 : 50 : 10 : 40) a dvakrát prepláchnutý odfarbovacím roztokom (methanol, kyselina octová, voda – 15 : 10 : 75). V závislosti na intenzite zafarbenia bol gél ponechaný na odfarbovanie cez noc.

Detekcia bielkovín pomocou farbenia striebrom

Na farbenie proteínov striebrom boli použité roztoky v Tab. 18.

Tab. 18 Roztoky používané na farbenie striebrom

Fixačný roztok	50% methanol, 12% kyselina octová, 35%formaldehyd, Milli Q voda
Premývací roztok	35% ethanol
Roztok zvyšujúci citlivosť gélu	0,02% Na ₂ S ₂ O ₃
Farbiaci roztok	0,2% AgNO ₃ , 35% formaldehyd
Vyvíjací roztok	6% Na ₂ CO ₃ , 35% formaldehyd, 0,0004% Na ₂ S ₂ O ₃
Ukončovací „stop“ roztok	50% methanol, 12% kyselina octová

Gél bol po vybratí z aparatury ponechaný vo fixačnom roztoku 30 minút za stáleho trepania. Potom bol 15 minút premývaný v premývacom roztoku, následne 2 minúty ponechaný v roztoku zvyšujúcom citlivosť. Znova bol gél premývaný 3 minúty. Následne bol aplikovaný farbiaci roztok po dobu 20 minút. Znova nasledovalo opláchnutie na 2 minúty. Potom bol gél ponechaný vo vyvíjacom roztoku, až kým neboli jasne vidieť zóny bielkovín. Nakoniec bol použitý ukončovací „stop“ roztok, ktorý vyvíjanie gélu zastavil [106]. Po nafarbení bol gél zaznamenaný rovnako ako v prechádzajúcich prípadoch.

4.4.2.6.Vyhodnotenie

Veľkosť fragmentov vzniknutých elektroforetickým delením bola určovaná pomocou štandardov, ktoré boli nanosené na príslušný gél spolu so vzorkami.

Odfarbený gél bol snímaný kamerou UltraCam (Pharmacia Biotech) za použitia Electronic Dualvawe Transluminator (Pharmacia Biotech), vyhodnotený softwarom Ultralum TotalLab a uchovaný vo fólii. Pretože software umožňuje len čiernobiely záznam, boli všetky gély skenované pomocou skenera za účelom získania farebného záznamu.

Vyhodnotenie výsledkov vertikálnej PAGE-SDS elektroforézy bolo prevedené pomocou dokumentačného systému Ultralum zloženého z duálneho transluminátora, integrujúcej CCD kamery, riadiacej jednotky a analytického softwaru Ultralum TotalLab pre 1D analýzu.

Gély z jednotlivých experimentov boli po ukončení elektroforéz umiestnené do priestoru duálneho transluminátora. Gély s nanesenými bielkovinami boli umiestňované na plochu osvetľovanú viditeľným svetlom. Po zapnutí kamery bol spustený program Scion Image a vybraná ponuka Special a potom Start capturing, čím bolo nastavené snímanie.

Základné ovládanie kamery umožňovalo zväčšovanie (zmenšovanie), zaostrovanie a presvecovanie snímaného objektu. Potom, čo boli získané záznamy vzoriek v dostatočnej ostrosti, bol obrázok uložený vo formáte *.tif.

4.4.4 Western blot

Vzorky proteínov z jabĺk na analýzu boli najprv separované pomocou PAGE-SDS na 10% géle (separačný gél - 1M Tris, pH 8,8; 10% SDS, 30% akrylamid, 10% APS, TEMED, H₂O; koncentračný gél - 1M Tris, pH 6,8; 10% SDS, 30% akrylamid, 10% APS, TEMED, H₂O). Vzorky na analýzu boli upravené štandardne (tj vzorkový pufer, var 3 min) a potom boli nanesené na pripravený 10% gél. Analýza bežala 1 – 2 hod, najprv pri 120V, kým vzorky nedoputovali do gélu, potom pri 150V.

Po separácii bol prevedený transfer na PVDF membránu. Gél bol vyrezaný, následne premytý v transferovom pufre (15,1 g TRIS a 72,1 g glycínu do 500 ml deionizovanej vody, z toho odobrať 8 ml, a k tomu pridať 20 ml methanolu, 1 ml 10% SDS, doplniť vodou na 100 ml), a potom bol zostavený tzv. „sandwich“ – papier pre blotting navlhčený v transferovom pufre, navlhčená membrána, gél po elektroforéze, navlhčený papier pre blotting. Takto pripravená membrána s gélom bola vložená do zariadenia Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad), na ktorom prebehla analýza. Celý prenos na membránu trvá cca 1 hod, pri 400 mA za stáleho chladenia.

Po prenose došlo k imunodetekcii (laboratórna teplota, jemné trepanie). Membrána bola premytá vo vode a v PBS pufre (20x koncentrovaný - 80 g NaCl, 35.8 g Na₂HPO₄·12 H₂O a 15.6 g NaH₂PO₄ · 2 H₂O, doplniť vodou na 1000 ml). Nešpecifické miesta na membráne boli blokované roztokom odtučneného mlieka 30 min pri laboratórnej teplote a potom v chladnej miestnosti cez noc. Na druhý deň došlo k pridaniu protilátky. Pre zníženie nešpecifity bola primárna protilátka riedená v TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl) a potom bola pridaná k membráne, s ktorou bola inkubovaná 3 hod. Po premytí PBS pufrom bola pridaná sekundárna protilátka (anti-goat, anti-rabbit), s ktorou bola membrána opäť inkubovaná 1 hod. Po ďalšom premytí došlo k detekcii. Sekundárna protilátka je obvykle spojená s reportujúcim enzýmom (chrenová peroxidáza). Tá sa využíva na štiepenie chemiluminiscenčného činidla, pričom výsledkom reakcie je luminiscencia v pomerovej časti k veľkosti proteínu. Táto luminiscencia bola zachytená na citlivý fotografický film.

Táto metóda bola prevedená v spolupráci s laboratóriami Max F Perutz, Viedeň, oddelenie chromozómovej biológie.

4.4.5 Mikrofluidné elektroforetické systémy

Na stanovenie proteínových vzoriek je najčastejšie používaná metóda PAGE-SDS. Avšak jednotlivé kroky analýzy sú často časovo náročné. Analýza pomocou mikrofluidných elektroforetických systémov slúži ako porovnávacia metóda ku klasickej separácii bielkovín, pričom zároveň predstavuje nové možnosti separovania bielkovín.

4.4.5.1 Zariadenie Experion pre stanovenie bielkovín mikrofluidnou technikou

Systém Experion (Bio-Rad, USA) (Obr. 18) pre mikročipovú elektroforézu používa kombináciu mikročipu LabChip od firmy Caliper Life Sciences (USA) a fluorescenčnej detekcie k rýchlemu stanoveniu a automatickej analýze vzoriek proteínov. Pomocou analýzy „all in one“ zahŕňajúc separáciu, detekciu a analýzu dát, systém Experion eliminuje mnohé zdĺhavé manuálne kroky pri analýze.

Systém Experion sa skladá z automatickej elektroforetickej stanice, nanášacej stanice pre gél, kitu pre analýzu bielkovín a programu na spracovanie a vyhodnocovanie dát.

Analýza vzoriek bielkovín je prevádzaná pomocou Experion Pro260 Analysis Kit, ktorý obsahuje reagenty a mikrofluidné čipy. Systém dokáže vyhodnotiť bielkoviny od 10 do 260 kD. Celá analýza trvá do 30 minút. Systém vykazuje menšie nároky na objem roztokov v porovnaní s PAGE-SDS a výhodou je vlastný proteínový štandard.

Experion Pro260 analysis kit obsahuje proteínový štandard Pro260 protein ladder, vzorkovací pufer, roztok gélu Pro260 gel, fluorescenčné farbivo Pro260 stain, membránové filtre a jednorazové mikrofluidné čipy. Každý čip môže analyzovať 10 vzoriek [107].

Centrom mikrofluidného systému je čip, ktorý obsahuje rad plastových jamiek viazaných v sklenenej doštičke. Doštička je viazaná s optimalizovanou sieťou mikrokanálikov. Sieť kanálikov je v doštičke vyleptaná. Keď sú kanáliky vyplnené gélom a vzorkami, elektroforetická stanica vedie vzorky kanálikmi pomocou špecificky ovládaného napätia a prúdu.



Obr. 18: Zariadenie na mikročipovú elektroforézu od firmy Bio-Rad

4.4.5.2 Príprava vzoriek a roztokov

Všetky roztoky boli uchovávané v chladničke, pred použitím museli byť ustálené na laboratórnu teplotu, jemne zvortexované a stočené na centrifúge 3-5 sekúnd. Tiež bolo dôležité zabrániť kontaktu roztokov so svetlom.

20 μ l fluorescenčnej farbičky *Pro260 stain* bolo pridaných do 520 μ l *Pro260 gel* skúmavky s gélom. Zmes bola krátko vortexovaná a následne stočená na centrifúge. Gélový roztok bol prefiltrovaný cez membránový filter 5 minút pri 10 000 ot/min. Takto prefiltrovaný gélový roztok sa môže používať 4 týždne, potom je potrebné roztok znova prefiltrovať.

Pre separovanie za redukčných podmienok sa pridáva do 30 μ l roztoku vzorkového pufru 1 μ l β -merkaptioethanolu. Za neredukujúcich podmienok sa používa 1 μ l deionizovanej vody na 30 μ l vzorkového pufru.

Proteínový štandard bol pripravený zmiešaním 2 μ l vzorkového pufru a 4 μ l Pro260 ladder v mikroskúmavke. Rovnako 2 μ l vzorkového pufru bolo pridaných ku vzorkám. Zmesi boli jemne vortexované a stočené na mikrocentrifúge 3 – 5 sekúnd. Následne boli všetky roztoky povarené 3 – 5 minút. Po vychladnutí boli stočené na cetrifúge 15 sekúnd. Ďalej bolo pridaných 84 μ l deionizovanej vody. Zmesi boli jemne stočené. V tomto momente boli vzorky aj štandard pripravené na naniesenie na čip.

4.4.2.3. Nanášanie gélu a vzoriek na čip, priebeh analýzy

Jednorázový čip (Obr. 19, Obr. 20) bol nasadený na nanášaciu gélovú stanicu. Bolo pipetovaných 12 μ l gélového roztoku do jamky s názvom GS (nanášacia jamka). Je potrebné dávať pozor na výskyt bublín, ktoré môžu zabrániť správnej polymerácii gélu. Nanášacia stanica bola uzavretá a boli nastavené podmienky tlaku a času podľa návodu výrobcu. Prístroj bol spustený a do jednej minúty bol gél hotový a pripravený na použitie.



Obr. 19: LabChip pre analýzu bielkovín



Obr. 20: Digitálne zobrazenie povrchu mikrofluidného čipu LabChip

Ďalej bolo pipetovaných 12 μ l prefiltrovaného gélového roztoku do štyroch jamiek GS, vrátane prvej nanášacej z prípravy gélu. Ďalej bolo pipetovaných 12 μ l prefiltrovaného gélu do jamky G. Jamky boli skontrolované, či sa v nich nevyskytujú bubliny. Následne boli nanášané vzorky o objeme 6 μ l do jamiek označených 1 až 10. Každá jamka musí byť zaplnená, inak nedôjde k analýze.

K analýze je potrebné postupovať v nasledovných krokoch: spustenie elektroforetickej stanice – spustenie Experion software – umiestnenie čipu na vyhradené miesto - v programe zadanie parametrov analýzy *New run* a protokol *Experion Pro260*. Po stlačení tlačítka *Start* nastala analýza. Po skončení analýzy program oznámi ukončenie nápisom *Run complete*.

Na záver je potrebné očistiť elektródy. Čistiaci čip bol naplnený 800 µl deionizovanej vody a bol umiestnený do automatickej elektroforetickej stanice, kde bol ponechaný asi 60 sekúnd.

4.4.2.4. Analýza dát

Na konci každej separácie zobrazuje Experion software elektroforetogram bielkovinného štandardu Pro260 ladder. Tento štandard generuje 9 pík. Software identifikuje prvý pík ako dolný nastavený marker pri 1,2 kD a posledný pík ako horný nastavený marker pri 260 kD. Píky medzi dolným nastaveným markerom a prvým píkom štandardu (10 kD) sú systémové píky. Ak bola separácia úspešná, tak je viditeľných všetkých deväť pík.

Pomocou Experion softwaru je možné určiť molekulové hmotnosti bielkovín aj koncentráciu bielkovín. Software je tiež schopný štatistického vyhodnocovania dát.

4.4.6 2D elektroforéza

4.4.6.1 Príprava vzorky na 2D analýzu

80-hodinová kultúra červených kvasiniek bola stočená, premytá a následne podrobená lyofilizácii, kde bola z buniek odstránená prebytočná voda. Lyofilizovaná kultúra bola nasledovne spracovávaná na 2D analýzu, ktorá prebiehala v spolupráci s Laboratóriom funkčnej genomics a proteomiky PŘF MU v Brne.

Lyofilizované bunky boli rozsuspendedované v lýzačnom pufre (močovina, CHAPS, DTT, inhibítory proteáz). Bunky boli rozbíjané kombinovaním mechanického vplyvu sklenených guľčiek s vortexovaním za chladu. Bol striedaný 5-6x vortex po 20-30 s so státím na ľade. Po lýze bolo overené množstvo proteínov vo vzorke Bradfordovou metódou. Ku proteínom bol potom pridaný vzorkový pufer.

4.4.6.2 Izoelektrická fokusácia

Na izoelektrickú fokusáciu boli použité IPG stripy od firmy Bio-Rad s lineárnym pH gradientom v rozmedzí pH 3–10. Rehydratácia stripov prebiehala v rehydratačnej/ ekvilibračnej miske. Rehydratačný pufer bol zložený z 7M močoviny, 2M thiomočoviny, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,8% amfolytu a 0,003% BPB. Proteínová vzorka v rehydratačnom pufre bola napipetovaná do kanálíku nádoby, následne bol na vzorku umiestnený IPG strip, ktorý bol potom jemne prevrstvený minerálnym olejom. Takto pripravené stripy boli ponechané k rehydratácii cca 11 – 16 hod.

Tab. 19: Doporučený rozsah proteinových nanášok na IPG stripy

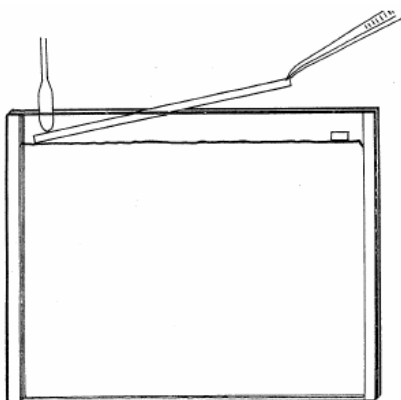
Dĺžka IPG stripu	7 cm	11 cm	17 cm	18 cm	24 cm
Objem rehydratačného pufru na strip	125 µl	200 µl	300 µl	315 µl	450 µl
Nanáška proteínu	5 – 20 µg	20 – 50 µg	50 – 80 µg	50 – 80 µg	80 – 250 µg

pri farbení striebrom					
Nanáška proteínu pri farbení Coomassie G-250	50 – 100 µg	100 – 200 µg	200 – 400 µg	200 – 400 µg	400 – 800 µg

Po rehydratácii prebehla izoelektrická fokusácia v aparátúre Protean IEF Cell od firmy Bio-Rad. Stripy boli umiestnené do fokusačnej nádoby, opäť boli zaliate minerálnym olejom a potom ponechané k analýze. Podmienky analýzy záviseli od druhu použitých stripov. Obvykle analýza prebiehala pri laboratórnej teplote, za limitujúceho prúdu 50 mA a za postupne stúpajúceho napätia od 250 – 8000 V, cez noc.

4.4.6.3 PAGE-SDS a farbenie gélu

Po izoelektrickej fokusácii bola prevedená ekvilibrácia stripu pred PAGE-SDS (ekvilibrčný pufr – 6M močovina, 0,375M Tris/HCl, pH 8,8, 2% SDS, 20% glycerol). Bol pripravený 2% DTT, v ktorom bol strip ekvilibrovaný 10 min a následne ďalších 10 min v 2,5% jódacetamide. PAGE gély boli pripravené klasickými postupmi. Pred nanosením stripov na gély boli stripy opláchnuté v elektródovom puffre. Po umiestnení stripu na vrch gélu sa naniesol aj proteínový štandard. Analýza prebiehala v aparátúrach PROTEAN Plus Dodeca Cell alebo v Mini-PROTEAN Cell od firmy Bio-Rad. Doba analýzy je závislá od veľkosti použitých gélov (gély rozmerov 20x20 cm bežali cca 17 hod).



Obr. 21: Vkladanie IPG stripu na PAGE gél

Farbenie gélu prebehlo tromi rôznymi spôsobmi – Coomassie Blue, striebro a SYPRO Ruby. Použitie Coomassie Blue je vhodné pre široké spektrum proteínov avšak s citlivosťou do 10 ng. Citlivejšia metóda je farbenie pomocou striebra s citlivosťou do 1 ng, avšak toto farbenie sa väčšinou nedá následne použiť na MS analýzu. Preto bolo prevažne používané farbenie so SYPRO Ruby, ktoré tiež zaručuje vysokú citlivosť do 1 ng a vyrezané proteíny môžu byť následne analyzované pomocou MS.

4.4.6.4 Analýza obrazu

Analýza obrazu bola prevedená pomocou programu PD QuestTM. Pomocou programu je možné vyhodnotiť nafotené gély kvalitatívne aj kvantitatívne.

4.4.7 Analýza proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie

4.4.7.1 Príprava vzorky pred MS analýzou

Po obrazovej analýze boli vybrané spoty bielkovín vyrezané z gélu a podrobené digescii trypsínom pomocou kitu od firmy Sigma - ProteoSilver Destainer. Získaná zmes peptidov bola podrobená MS analýze.

4.4.7.2 MS analýza

Peptidy získané digesciou trypsínom boli analyzované pomocou hmotnostnej spektrometrie. Metodicky boli použité techniky MALDI-MS a MALDI-MS/MS. Zmes peptidov po digescii bola zmiešaná s matricou (obvykle deriváty kyseliny škoricovej) a následne prebehla MS analýza.

MALDI/MS

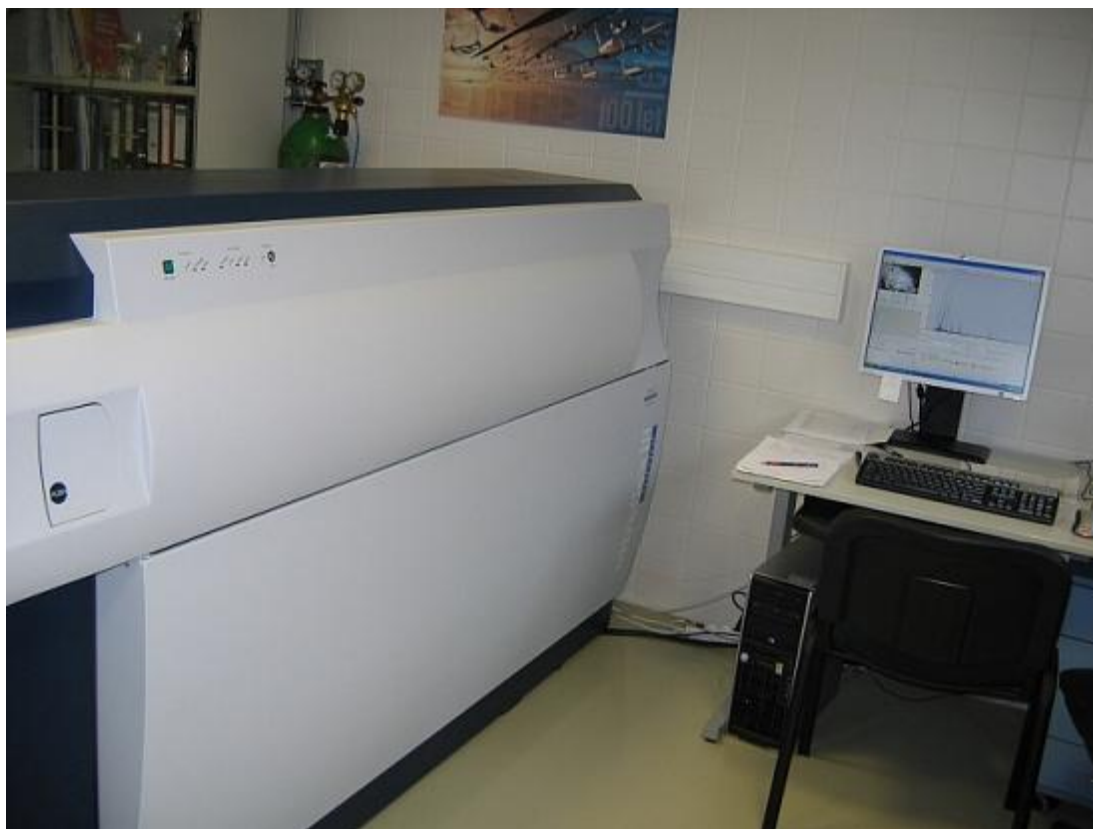
V prípade MALDI-MS získané MS spektrum obsahuje hmotnosti peptidov vzniknutých digesciou analyzovaných proteínov. Nameraná peptidová mapa bola prehľadávaná voči databáze proteínových sekvencií. Prehľadávací program si vytvára teoretickú peptidovú mapu od každej proteínovej sekvencie v databáze a postupne ju porovnáva s experimentálne nameranou peptidovou mapou nášho analyzovaného proteínu. Výsledkom prehľadávania bol rebríček proteínov s najpodobnejšími peptidovými mapami. Miera zhodnosti je vyjadrená formou tzv. skóre, čiže všetky proteíny s hodnotou skóre vyššou než limitnou sú programom považované za identifikované.

MS-MS

V prípade MALDI-MS-MS dochádza ku fragmentácii. MS-MS spektrum obsahuje fragmenty peptidu, ktoré vznikli kolíznou disociáciou v iónovej pasci. Tieto fragmenty nesú špecifickú informáciu o sekvencii peptidu. Namerané fragmentačné mapy boli následne prehľadávané voči databáze proteínových sekvencií. Prehľadávací program Mascot Search si vytvára teoretickú peptidovú mapu proteínovej sekvencie v databáze, potom si od každého peptidu príslušnej peptidovej mapy pripraví teoretickú fragmentačnú mapu a postupne ich porovnáva s experimentálnymi dátami. Toto prevedie pre každú proteínovú sekvenciu v databáze. Pre každý priradený peptid je spočítané individuálne skóre, ktorého hodnota vyššia než limitná určuje významnú zhodu medzi teoretickou a nameranou fragmentačnou mapou. Miera zhodnosti proteínu je vyjadrená celkovým skóre, ktoré je súčtom individuálnych skóre peptidov priradených danému proteínu.

Prístroj pri zbere MS dát pracoval v reflektónovom móde s detekciou pozitívnych iónov. Jednotlivé vzorky (1 µl) boli nanosené na vzorkovaciú doštičku s hydrofilnými „kotvami“ AnchorChip a následne boli prekryté roztokom matrice (1 µl). Ako matrica bola použitá α-kyano-4-hydroxyškoricová kyselina (CHCA). Zmes sa ponechala schnúť pri laboratórnej teplote. Po úplnom zaschnutí bola vzorka analyzovaná. Kalibrácia bola prevedená metódou externej kalibrácie. Vyhodnotenie dát bolo prevedené pomocou programov Flex Analysis 3.0 a MS Biotoools 3.1 (Bruker Daltonik).

Na spracovanie MS a MS/MS dát bol použitý vyhľadávací program MASCOT 2.2 (MatrixScience, UK). K databázovému vyhľadávaniu bola použitá NCBI proteínová databáza. Povolená hmotnostná tolerancia pre MALDI-MS dáta bola pre peptidové mapovanie 30 ppppm a pre MS/MS dáta 0,6 Da. Vyhľadávanie bolo prevedené bez taxonomických obmedzení. Všetky MS experimenty boli prevedené v spolupráci s laboratóriom funkčnej genomiky a proteomiky PŘF MU v Brne.



Obr. 22 Hmotnostný spektrometer MALDI-TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics), na ktorom bola prevedená väčšina MS analýz

4.4.8 Analýza antioxidačných enzýmov

4.4.8.1 Antioxidačné enzýmy v jablkách

V odrodách jablák Idared, Golden Delicious a Jonagored, skladovaných v dvoch rôznych atmosférach, boli stanovované tri enzýmy - superoxiddismutáza (SOD), kataláza (CAT) a polyfenoloxidáza (PPO).

Stanovenie SOD

Aktivita enzýmu superoxiddismutáza bola stanovovaná pomocou kitu Ransod od firmy Randox. Súprava sa používa na stanovenie SOD vo vzorkách krvi pri 37°C. Z opakovaných pokusov a tiež z literatúry bolo zistené, že kit je použiteľný aj na stanovenie enzýmov z rastlinných vzoriek, a preto bol používaný aj v našom prípade [108].

Princíp stanovenia spočíva v tom, že xanthinoxidáza generuje z xanthinu superoxidový radikál, ktorý reaguje s 2-(4-iodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazolium chloridom za vzniku červeno sfarbeného roztoku formazanu. SOD vychytáva vzniknuté superoxidové radikály a bráni tak tvorbe červeného komplexu.

K analýze bolo vždy braných 0,1 g pod dusíkom zmrazenej vzorky, ktorá bola rozpustená v 10 ml fosfátového pufru. Keďže vzorka obsahovala aj nerozpustné časti jablka, tak pred samotnou analýzou musela byť centrifugovaná. Ďalej sa postupovalo podľa návodu z kitu. Absorbancia sa merala pri vlnovej dĺžke 505 nm proti vzduchu. Výpočet bol prevedený na základe vzorcov v manuáli kitu.

Stanovenie CAT

Stanovenie aktivity katalázy bolo optimalizované pomocou viacerých metodík. Je možné stanovovať aktivitu manganometricky [109], kitom od firmy Sigma či spektrofotometricky [18, 25]. V tomto prípade bola použitá spektrofotometrická metóda.

Princíp metódy spočíva v tom, že k roztoku peroxidu vodíka o známej koncentrácii sa pridá vzorka obsahujúca katalázu. Kataláza rozkladá peroxid vodíka na vodu a kyslík, pričom sa meria úbytok peroxidu vodíka v roztoku v závislosti na čase.

K analýze bol podobne ako pri stanovovaní SOD použitý 1 g dusíkom zmrazeného jablka v 10 ml fosfátového pufru. Po odstredení pevných podielov bola vzorka pipetovaná k roztoku peroxidu, pričom sa merala absorbancia po 1,5 min pri 240 nm proti fosfátovému pufru. Výpočet bol prevedený na základe Lambert-Beerovho zákona.

Stanovenie PPO

Nevýhodou práce s polyfenoloxidázou je časový faktor, keďže enzým rýchlo reaguje so vzdušným kyslíkom a oxiduje. Na stanovenie aktivity bola použitá spektrofotometrická metóda s 4-methylcatecholom [110].

Princíp stanovenia spočíva v reakcii roztoku 4-methylcatecholu s kyslíkom a PPO za vzniku oranžového roztoku benzochinónu, ktorý sa následne pomalou reakciou s vodou mení na hnedý melanín. Spektrofotometricky sa meria zmena koncentrácie methylcatecholu pri 400 nm.

K analýze bol opäť použitý 1 g mrazenej vzorky vo fosfátovom pufré. Bola zmeraná absorbancia po 30 s a po 2,5 min proti fosfátovému pufru. K výpočtu bol použitý Lambert-Beerov zákon.

Všetky tri enzýmy boli stanovované aj v čerstvo vytlačenej jablkovej šťave. Postupy analýzy týchto vzoriek sa zhodujú s vyššie popísanými postupmi.

4.4.8.2 Antioxidačné enzýmy v jačmeni a v slade

Stanovenie LOX

Princíp metódy spočíva v reakcii nenasýtených mastných kyselín s kyslíkom a lipoxygenázou za vzniku peroxidov nenasýtených mastných kyselín [41]. V tomto prípade bola ako nenasýtená mastná kyselina použitá kyselina linolová. Reakcia prebiehala v prostredí borátového pufru. Po prídavku enzýmu k substrátu sa ihneď zmerala absorbancia v UV oblasti pri 234 nm a potom sa zmerala opäť po 1 min. Aktivita LOX-1 bola vypočítaná z rozdielu absorbancií na základe Lambert-Beerovho zákona.

4.5 Izolácia a analýza ostatných antioxidačných látok v komplexných vzorkách

Kvôli lepšiemu vyhodnocovaniu proteínových a enzýmových charakteristík boli analyzované aj vybrané antioxidačné látky v komplexných biologických vzorkách. Z kvasiniek boli izolované karotenoidy, v jablkách boli stanovované celkové polyfenoly a flavonoidy a aj v jablkách aj v jačmeňoch a sladoch bola sledovaná celková antioxidačná kapacita.

4.5.1 Spracovanie vzoriek pred analýzou

Kvasinky

Spracovanie kvasinkových buniek bolo po kultivácii popísané v kapitole 4.2.1.4. K analýze karotenoidov museli byť použité čerstvo pripravené bunkové extrakty, pretože ich pretože uchovávaním dochádza k úbytku metabolitov. Keďže karotenoidy sú súčasťou lipidických frakcií buniek kvasiniek, tak ich izolácia spočívala vo viacstupňovej extrakcii organickými rozpúšťadlami. V odbornej literatúre boli publikované rôzne metódy izolácie karotenoidov [111], využívajúce k extrakcii organické rozpúšťadlá. V tejto práci bol použitý spôsob, ktorý bol optimalizovaný v našom laboratóriu v predchádzajúcich prácach [112]. Bunky boli v tretej miske dezintegrované trením v 50 ml acetónu. Potom bolo pridaných 50 ml KOH a zmes bola zmydľovaná 30 min vo vodnom kúpeli pri 90°C. Zmydlený odparok bol 3x extrahovaný diethyleterom. Spojené etherové frakcie boli odparené na vákuovej odparke. Odparky boli následne rozpustené v 1 ml ethanolu pre HPLC a prevedené do mikrocentrifugačných skúmaviek.

Pred analýzou boli vzorky ešte prefiltrované cez membránový filter a odstredené na mikrocentrifúge.

Jablká

Jablká na stanovenie nízkomolekulových antioxidantov boli nastrúhané na plastovom strúhadle, hmota bola prefiltrovaná cez dvojjitú gázu a takto získaná surová šťava bola následne analyzovaná.

Jačmene a slady

Postup prípravy vzoriek pre analýzu nízkomolekulových antioxidantov z jačmeňa a sladu sa zhoduje s postupom na prípravu vzoriek pre analýzu proteínov, popísaný v kap. 4.3.3.

4.5.2 Analýza celkových polyfenolov

Celkový obsah polyfenolov vo vybraných vzorkách bol stanovovaný fotometrickou metódou s Folin-Ciocaltauovým činidlom. Ako štandard bol braný 6 mol/l roztok kyseliny gallovej. K analýze bolo vždy Folin-Ciocaltauové činidlo riedené vodou v pomere 1 : 9. Tiež bol používaný nasýtený roztok uhličitanu sodného (7,5 g NaCO₃ + 95 ml H₂O) [113].

Počas každej analýzy bol do skúmaviek pipetovaný 1 ml Folin-Ciocaltauovho činidla, 1 ml H₂O a 50 µl analyzovaného extraktu. Po premiešaní bola zmes ponechaná 5 min stáť. Potom bol pridaný 1 ml nasýteného uhličitanu sodného a po premiešaní boli opäť zmesi ponechané stáť, tentoraz 15 min. Potom bola zmeraná absorbancia na spektrofotometri Helios δ voči slepej vzorke pri 750 nm. Štandardizácia prebehla premeraním kalibračného radu roztokov kyseliny gallovej o obsahu 110 – 560 mg/l.

4.5.3 Analýza celkových flavonoidov

Princíp metódy stanovenia celkových flavonoidov spočíva v reakcii vzorky s hlinitou soľou a dusitanom. Ako štandard bol použitý katechín. Na analýzu bol použitý 5% dusitan sodný, 10% chlorid hlinitý, 1 mol/l hydroxid sodný a 1 mol/l roztok katechínu [113].

Samotná analýza prebiehala zmiešaním 0,5 ml vzorky s 1,5 ml vody. Následne bolo pridaných 0,2 ml 5% NaNO₂, po premiešaní bola zmes ponechaná stáť 5 min, aby potom bolo pridaných 0,2 ml 10% AlCl₃. Zmes bola opäť premiešaná a ponechaná stáť 5 min. Na koniec bolo pridaných 1,5 ml NaOH a 1 ml H₂O a po premiešaní stála zmes ďalších 15 min. Následne sa merala absorbancia na spektrofotometri Helios δ voči destilovanej vode pri 510 nm. Štandardizácia prebehla premeraním kalibračného radu roztokov katechínu rozpusteného v absolútnom ethanole o obsahu katechínu 110 – 560 mg/l.

4.5.4 Metóda ABTS

Celková antioxidačná kapacita sa stanovovala pomocou diagnostickej súpravy „Total Antioxidant Status“, TAS, od firmy Randox. Analýza bola prevedená podľa návodu v kite. Princíp analýzy spočíva v sledovaní inhibície premeny chromogénu substrátom. Čím vyššia je

absorbancia danej zmesi, tým viac chromogénu bolo premeneného a to znamená, že pridaná vzorka bola menším antioxidantom, lebo nebola schopná vychytať radikály pôsobiace na chromogén.

Práškové chemikálie obsiahnuté v kite boli prevedené do roztoku. Potom boli roztoky pipetované do zúžených kyviet podľa Tab. 20.

Tab. 20 Pipetované objemy na ABTS

	blank	Štandardná vzorka	Analyzovaná vzorka
deionizovaná voda	10 µl	8 µl	8 µl
štandard	-	2 µl	-
vzorka	-	-	2 µl
chromogén	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Koncentrácia modrozeleného ABTS bola meraná spektrofotometricky pri 600 nm. Celková antioxidačná aktivita bola porovnaná so štandardom kyseliny 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylovej (trolox) a vyjadrená rovnicou:

$$faktor = \frac{C_{št}}{\Delta A_{blank} - \Delta A_{št}}$$

$$ABTS(mmol/l) = faktor \cdot (\Delta A_{blank} - \Delta A_{vzorky})$$

4.5.5 Analýza nízkomolekulárnych antioxidačných látok metódou HPLC/UV-VIS a HPLC/PDA/ESI-MS

Chromatografická analýza karotenoidov prebiehala na zostave HPLC/UV-VIS od firmy ECOM spol. s r.o. K spracovaniu dát a chromatogramov bol použitý chromatografický software CSW 1.7 a software Clarity. Separácia prebiehala izokraticky, kde ako mobilná fáza pre separáciu karotenoidov bola použitý methanol pre HPLC, prietok mobilnej fázy bol 1,1 ml/min. Analýza bežala pri 45°C na nerezovej kolóne C18 s predradenou predkolónou. Vzorka bola na kolónu dávkovaná ventilom s dávkovacou smyčkou o objeme 20 µl. Separované analyty boli detekované fotometricky pri vlnových dĺžkach odpovedajúcich maximu absorbancie príslušnej analyzovanej látky (450 nm pre karotenoidy).

Identifikácia karotenoidov bola prevedená na základe chromatografickej analýzy štandardov karotenoidov pri daných vlnových dĺžkach. Stanovenie množstva vybraných karotenoidov bolo prevedené pomocou externej kalibrácie metódou kalibračnej krivky. Ku kvantitatívnemu vyhodnoteniu bola použitá závislosť plochy píkovej jednotlivých štandardov na koncentrácii.

Karotenoidy boli tiež analyzované pomocou HPLC/PDA/ESI-MS analýzy. Separácia bola prevedená rovnako ako u vyššie popísaného postupu (HPLC/UV-VIS). Na PDA boli zaznamenávané chromatogramy súčasne pri rôznych vlnových dĺžkach (450 nm, 350 nm a 290 nm), potom boli analyzované spektrá karotenoidov. Jednotlivé karotenoidy boli analyzované online metódou HPLC/PDA/ESI-MS (detektor PDA Finnigan Surveyor, MS detector LCQ Advantage Max, Thermo Finnigan) za rovnakých podmienok (kolóna, mobilná

fáza, podmienky separácie) ako u HPLC/-UV-VIS. Prietok mobilnej fázy bol 0,5 ml/min, hmotnostné spektrá boli analyzované pomocou online ESI ionizácie v negatívnom móde. Hmotnostná analýza prebehla tiež offline. Oddelené frakcie karotenoidov boli zozbierané, zmiešané s chloroformom (50:50, v/v) a nastrekované priamo do spektrometra (MS LCQ Advantage Max, iónová pasca s ionizáciou elektrosprejom). ESI-MS spektrá boli zaznamenané v rozsahu m/z 400 – 600. Teplota v kapiláre bola nastavená na 150°C, napätie bolo 16V a tok dusíku bol nastavený na 30 (dopredu dohodnutá jednotka) [114, 115].

Stanovenie retinolu a α -tokoferolu bolo prevedené metódou simultánnej HPLC, kde došlo k programovanej zmene vlnovej dĺžky. Parametre separácie boli podobné ako u vyššie spomínaných karotenoidov, čiže nerezová kolóna C18 s predkolónou, 45°C, izokratická elúcia za použitia methanolu pre HPLC. Prietok mobilnej fázy bol 1,1 ml/min. Objem dávkovacej smyčky bol 20 μ l. Separované analyty boli detekované spektrofotometricky v programovom móde: 0 – 3,5 min pri 325 nm (absorpčné maximum pre retinol) a 3,5 – 10 min pri 289 nm (absorpčné maximum tokoferolu). Dáta boli spracované pomocou rovnakého software ako karotenoidy.

5 VÝSLEDKY

Cieľom prvej časti predloženej práce bolo sledovanie zmien proteómu a metabolómu po zavedení rôznych regulačných procesov, ktoré mali za úlohu zvýšiť produkciu vybraných priemyselných metabolitov – karotenoidov. Zvýšená pozornosť bola venovaná vplyvu exogénnych stresových faktorov na bunky a následným zmenám proteínového profilu buniek. Experimenty boli prevedené na karotenogénnych kmeňoch kvasiniek. Druhá časť práce je venovaná skúmaniu proteómu a antioxidačných látok u vybraných rastlinných vzoriek vystavených stresu. V rámci práce boli testované a následne zavedené mnohé metodické postupy zamerané na izoláciu a analýzu vybraných druhov makromolekúl, enzýmov a ďalších metabolitov.

5.1 Analýza proteínov a antioxidačných látok izolovaných z kvasinkových mikroorganizmov

Analýza proteómu u kvasinkových mikroorganizmov bola prevedená najmä kvôli sledovaniu stresovej odozvy buniek. Bunky po vystavení rôznym stresovým podmienkam syntetizujú stresové proteíny (napr. HSP), ktoré chránia bunku pred ďalším vplyvom nepriaznivého prostredia. Dochádza tiež k zrýchleniu a spomaleniu určitých metabolických dráh, ktoré sú zodpovedné za adaptačné mechanizmy v bunke. K izolácii proteínov boli použité bunky, ktoré boli vystavené vplyvu exogénnych stresových faktorov počas rastu.

V predloženej práci boli použité dva druhy stresu – osmotický stres indukovaný vplyvom NaCl a oxidačný stres vyvolaný vplyvom H₂O₂ (kap. 4.2.1.2). Sady proteínov boli porovnávané s proteínami vyizolovanými z buniek kultivovaných za normálnych podmienok (kap. 4.2.1.1.) Po izolácii proteínov boli najprv boli prevedené 1D elektroforézy (kap. 4.4.3.), kde boli sledované proteínové profily vyizolované z jednotlivých druhov kvasiniek, ale keďže nebolo možné už po 1D elektroforézach vybrať jednotlivé proteíny na MS analýzu, boli následne prevedené aj 2D elektroforézy (kap. 4.4.6.).

Sledovanie stresovej odozvy bolo zaznamenávané aj na metabolómovej úrovni. Po aplikácii stresových faktorov počas produkcie biomasy bol analyzovaný vplyv na mieru tvorby karotenoidov (membránové antioxidanty) a ergosterolu (stabilizačná zložka kvasinkových biomembrán). Ako hlavný modelový organizmus bola vybratá kvasinka *Rhodotorula glutinis*, proteínové profily a antioxidačné látky však boli sledované aj na ostatných karotogénnych kmeňoch.

5.1.1 Morfológia a rastové charakteristiky použitých kmeňov kvasiniek

Morfológia (svetelný mikroskop, zväčšenie 640x) a rastové charakteristiky karotenogénnych kmeňov kvasiniek boli sledované u siedmich kmeňov: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces shibatanus* a *Cystofilobasidium capitatum* (kap. 5.1.1). Za optimálnych podmienok (26°C, 100 rpm) dochádza k nárastu buniek do 5 až 7 dní, u kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* je rast o niečo pomalší. Rastová krivka má u všetkých kmeňov charakteristický

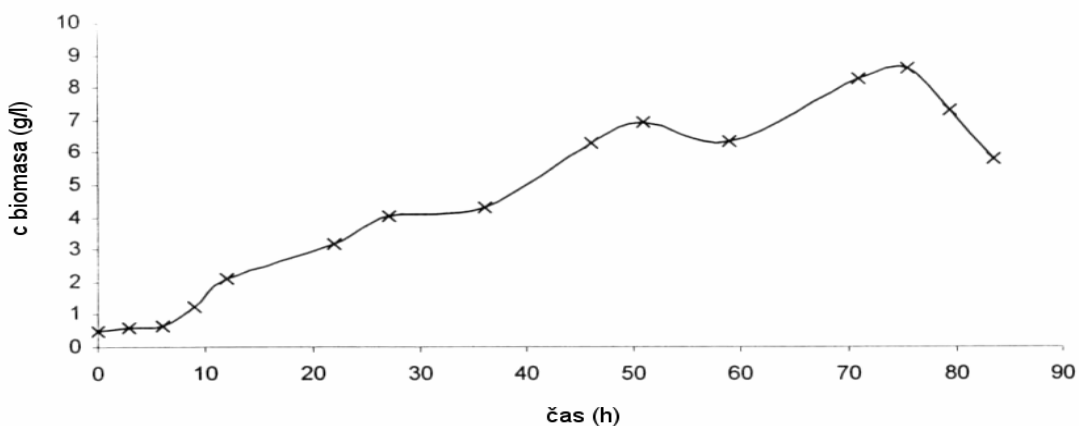
dvojstupňový charakter, kde stacionárna fáza nastáva okolo 50. hodiny rastu. Všetky kmene tiež vykazujú predĺženú stacionárnu fázu s často viacerými maximami rastu. Prvé maximum bolo pozorované u všetkých kmeňov okolo 80. hodiny rastu, preto aj všetky metabolity pre ďalšie experimenty boli izolované z 80h rastových kultúr. Maximum rastu je zhodné aj s maximom obsahu karotenoidov, ktoré ako sekundárny metabolit sú produkované v stacionárnej fáze s maximom práve okolo 80 h. Výsledky produkcie karotenoidov sú uvedené v kap. 5.1.5. β -karotén ako hlavný karotenoid bol analyzovaný vo všetkých vzorkách kvantitatívne, taktiež lykopén. Produkcia lykopénu bola nižšia najmä preto, že lykopén slúži ako acyklický prekursor karotenoidov. Kvalitatívne bol stanovený torulén, hydroxytorulén a torularhodin. Tiež boli stanovené celkové karotenoidy [115]. U časti kmeňov boli podobné testy v našom laboratóriu prevedené už v minulosti, avšak s inými stresovými faktormi, či ich inou koncentráciou [116, 117].

5.1.1.1 *Rhodotorula glutinis*



Obr. 23 Morfológia kmeňa *Rhodotorula glutinis* a ukážka náteru na agare

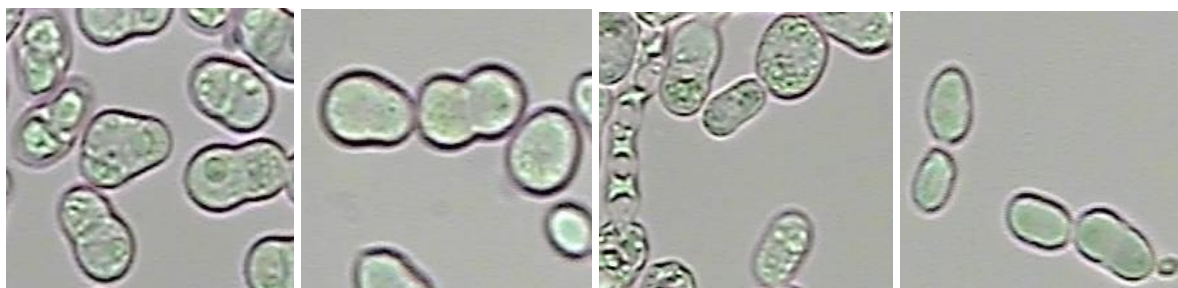
Bunky kmeňa *Rhodotorula glutinis* sú guľaté až jemne oválne a tvoria retiazky, ktoré sú charakteristické pre rod *Rhodotorula* [22]. Je vidieť tiež vrstvu akumulovaných pigmentov na vnútornej strane cytolazmatickej membrány. Náter na agare je oranžový až červený, hladký, jemne slizký.



Graf 1 Rastová krivka u kvasinky *Rhodotorula glutinis*

Kvasinka *Rhodotorula glutinis* má typický dvojfázový charakter rastovej krivky (Graf 1), ktorý je typický aj pre ostatné karotenogénne kmene, ako bude vidieť na ďalších grafoch. Takáto tendencia rastu bola popísaná už aj v predchádzajúcich prácach [112, 118]. K produkcii pigmentov dochádza najmä okolo 70 – 80-tej hodiny rastu.

Ťažiskom experimentov bolo sledovanie vplyvu stresových faktorov v živnom médiu na rast kvasiniek. Pozorovanie morfológických zmien signalizuje schopnosť buniek adaptovať sa novým životným podmienkam tak, aby nedochádzalo k usmrcovaniu buniek, ba čo viac, vybrané druhy exogénneho stresu podnietili kvasinky k zvýšenému rastu aj k zvýšenej produkcii vybraných metabolitov. V tomto prípade je vidieť zmeny v morfológii u kvasinky *Rhodotorula glutinis* (Obr. 24). Oxidačný stres vo forme prídavku peroxidu vodíka do živného média spôsobuje elipsoidný tvar buniek, ktoré sú ale veľmi podobné kontrolnej vzorke. Prítomnosť osmotického stresu vo forme prídavku NaCl spôsobuje guľatý tvar buniek, ktoré sú však na priložených mikroskopických snímkach ešte v procese delenia, a preto majú jemne sploštený tvar. Bunky vystavené rastu v stresových podmienkach majú spoločnú vlastnosť, ktorou je stenčenie bunkovej steny z dôvodu vyššieho obsahu karotenoidov, ktorý bunky za stresových podmienok produkujú.

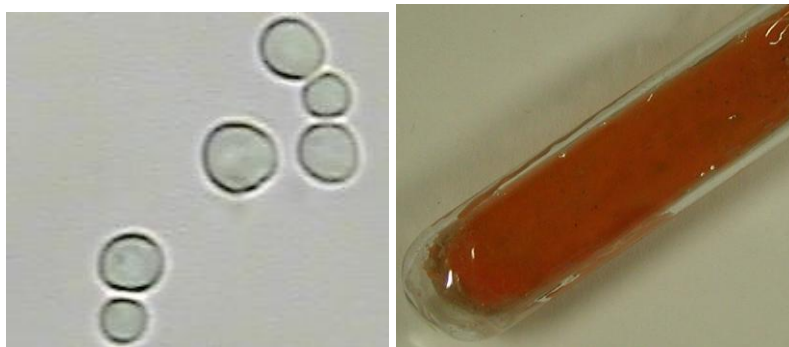


Obr. 24 Morfológia buniek *Rhodotorula glutinis* po raste v prítomnosti stresových faktorov, zľava: 5mM H_2O_2 , 2mM H_2O_2 , 2% NaCl, 5% NaCl

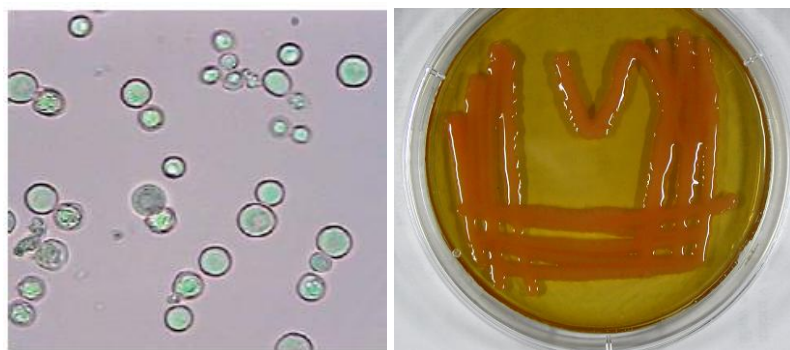
Zmeny morfológie u ostatných kmeňov boli porovnateľné so zmenami u kvasinky *Rhodotorula glutinis*. Mikroskopické snímky ostatných kmeňov je možné vidieť v kap. 5.1.1.2, 5.1.1.3 a 5.1.1.4.

5.1.1.2 *Rhodotorula rubra* a *Rhodotorula aurantiaca*

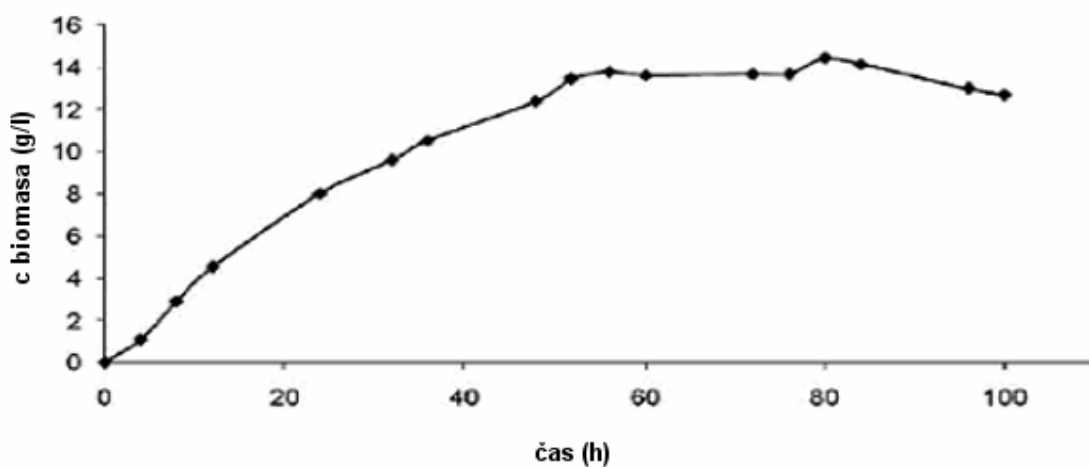
Bunky kmeňov *Rhodotorula rubra* a *Rhodotorula aurantiaca* sú z morfológického hľadiska veľmi podobné kmeňu *Rhodotorula glutinis*. Sú guľaté, tvoria retiazky a tiež je viditeľná vrstva pigmentov. Náter na agare je oranžový až červený, hladký, jemne slizký.



Obr. 25 Morfológia kmeňa *Rhodotorula rubra* a ukážka šikmého agaru

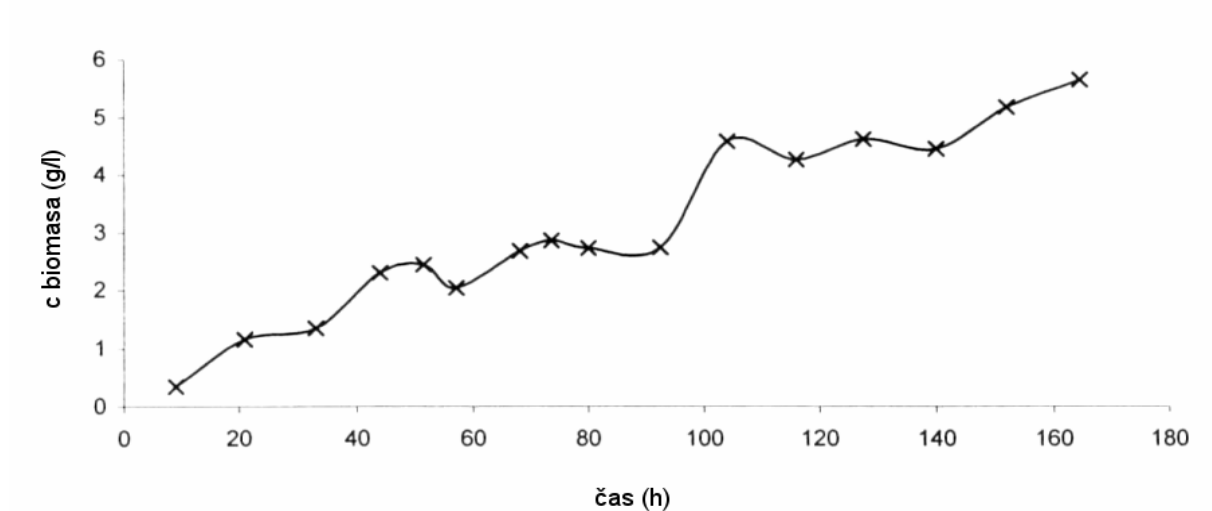


Obr. 26 Morfológia kmeňa *Rhodotorula aurantiaca* a ukážka náteru na agare



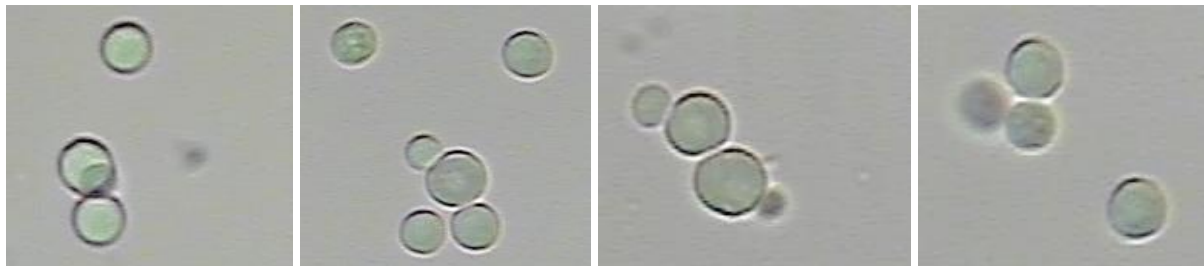
Graf 2 Rastová krivka u kvasinky *Rhodotorula rubra*

Kvasinka *Rhodotorula rubra* vykazuje podobný charakter rastu ako kmeň *Rhodotorula glutinis*. Typický je dvojstupňový nárast biomasy s predĺženou stacionárnou fázou, ktorý v uvedenom experimente (Graf 2) vykazuje miernejší priebeh [119].



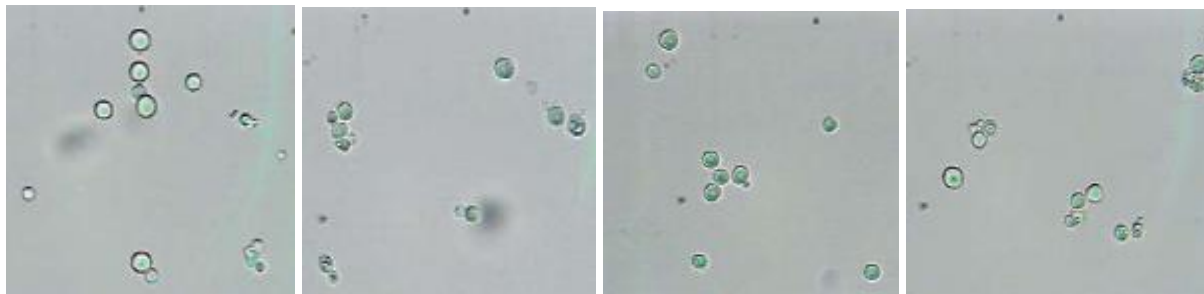
Graf 3 Rastová krivka u kvasinky *Rhodotorula aurantiaca*

U kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* bola zaznamenaná rastová krivka až do 160tej hodiny rastu. Krivka vykazuje dve rastové maximá, ako aj ostatné karotenogénne kmene. Z dôvodu zachovania kontinuity experimentov boli aj u tejto kvasinky izolované metabolity z 80tej hodiny rastu.



Obr. 27 Morfológia buniek *Rhodotorula rubra* po raste v prítomnosti stresových faktorov, zľava: 5mM H_2O_2 , 2mM H_2O_2 , 2% NaCl, 5% NaCl

Morfologické zmeny počas pôsobenia stresových faktorov nie sú u kvasinky *Rhodotorula rubra* tak jasne pozorovateľné ako u kmeňa *Rhodotorula glutinis*. U kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* dochádza k zvýšenej akumulácii pigmentov u 2mM H_2O_2 a u 2% NaCl.



Obr. 28 Morfológia buniek *Rhodotorula aurantiaca* po raste v prítomnosti stresových faktorov, zľava: 2mM H_2O_2 , 5mM H_2O_2 , 2% NaCl, 5% NaCl

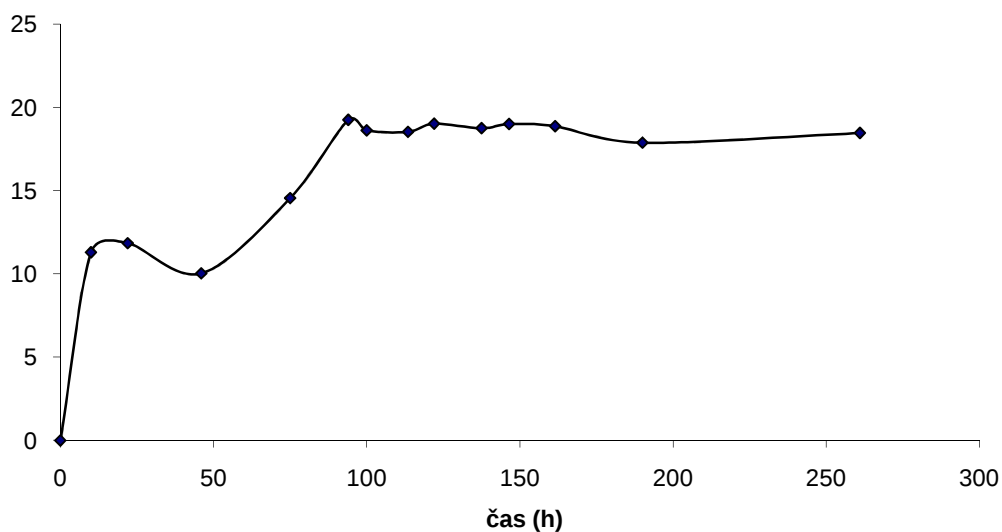
5.1.1.3 *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces shibatanus*

Aj kvasinky rodu *Sporobolomyces* patria medzi karotogénne kmene kvasiniek a vykazujú podobné vlastnosti ako kvasinky rodu *Rhodotorula*. Patria ale do čeľade *Sporobolomycetaceae*, pričom hlavný rozdiel oproti rodu *Rhodotorula* spočíva v tvorbe spór. Inak je morfológia buniek rodu *Sporobolomyces* veľmi podobná bunkám rodu *Rhodotorula* [22, 120]. Podobnosť je vidieť aj na rastových krivkách, ktoré vykazujú typický dvojstupňový charakter.



Obr. 29 Morfológia kmeňa *Sporobolomyces salmonicolor* a ukážka náteru na agare

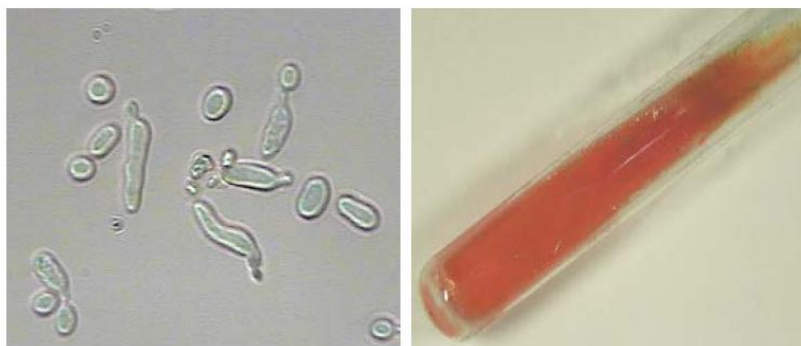
Bunky kmeňa *Sporobolomyces salmonicolor* majú guľatý tvar. Nedochádza k tak patrnému retiazkovaniu ako u kmeňov rodu *Rhodotorula*. Náter na agare je oranžový až lososový, hladký, lesklý, jemne slizký.



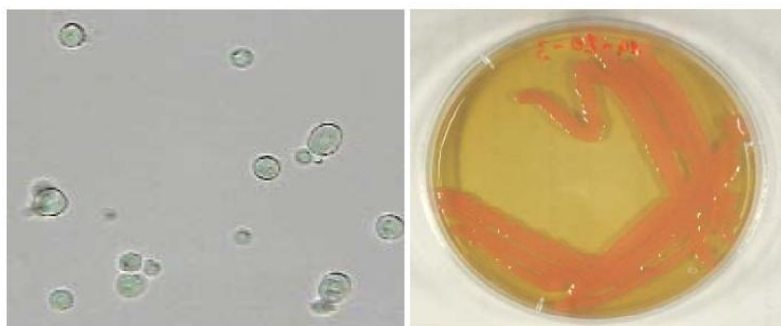


Obr. 30 Morfológia buniek *Sporobolomyces salmonicolor* po raste v prítomnosti stresových faktorov, zľava: 2mM H_2O_2 , 5mM H_2O_2 , 2% NaCl, 5% NaCl

Zmeny morfológie po pôsobení stresových faktorov nie sú u kvasinky *Sporobolomyces salmonicolor* tak patrné.

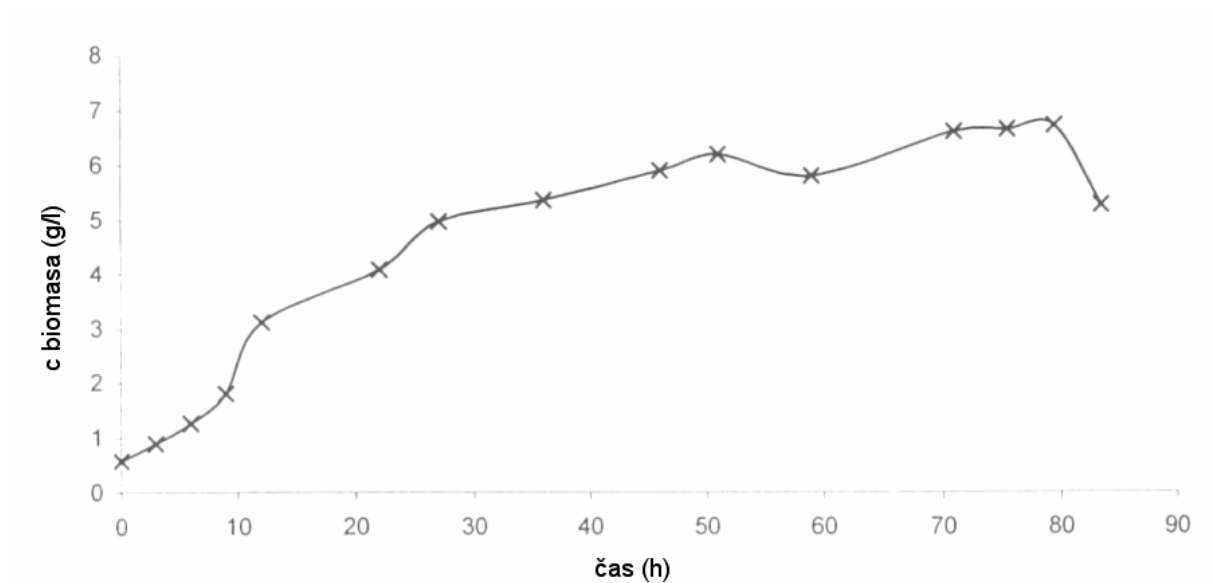


Obr. 31 Morfológia kmeňa *Sporobolomyces roseus* a ukážka šikmého agaru

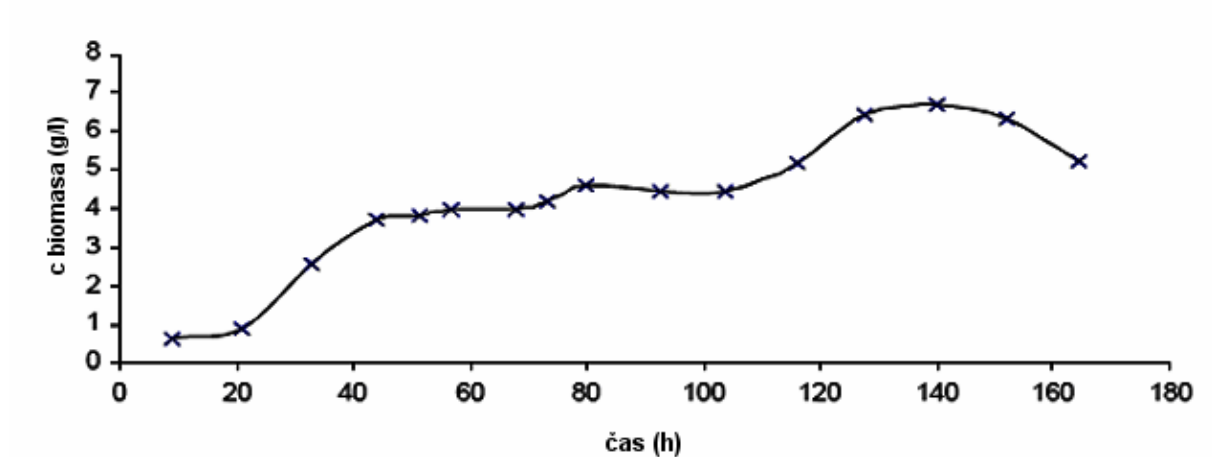


Obr. 32 Morfológia kmeňa *Sporobolomyces shibatanus* a ukážka náteru na agare

Bunky kmeňov *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces shibatanus* majú bunky jemne pretiahnuté až elipsovité. K tvorbe retiazok dochádza občasne. Náter na agare je oranžový až lososovo ružový, hladký a slizký.

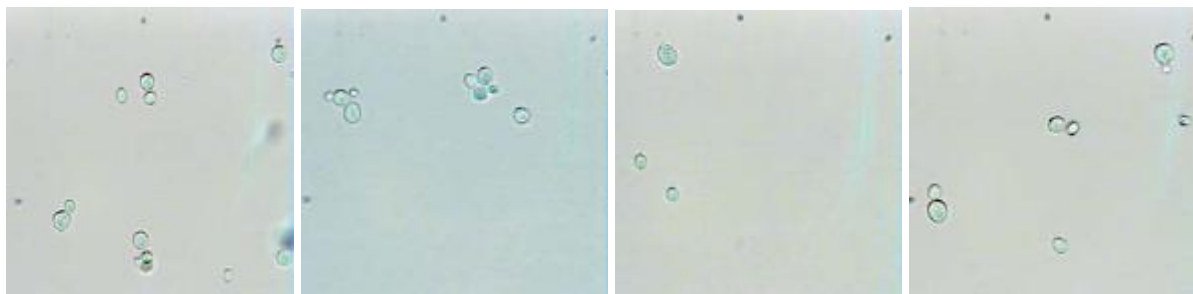


Graf 5 Rastová krivka u kvasinky *Sporobolomyces roseus*

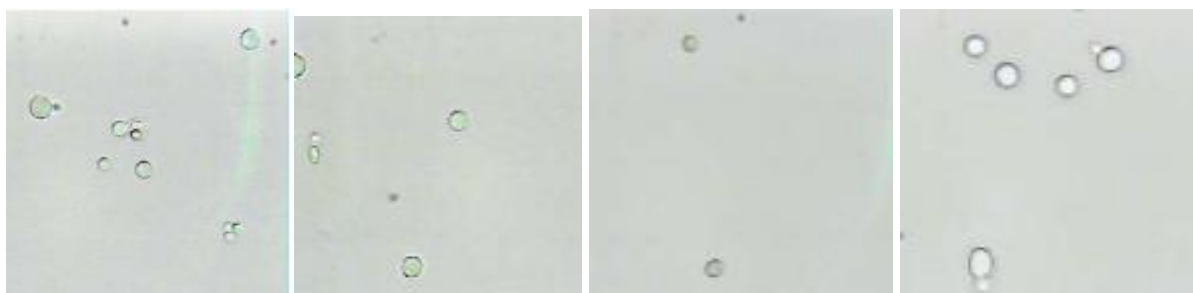


Graf 6 Rastová krivka u kvasinky *Sporobolomyces shibatanus*

Kvasinky *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces shibatanus* (Graf 5, Graf 6) vykazujú podobný charakter rastu ako kvasinky kmeňa *Rhodotorula* (kap. 5.1.1.1, 5.1.1.2). Charakteristická je predĺžená stacionárna fáza, pričom prechod z exponenciálnej do stacionárnej fázy nastáva už okolo 40tej hodiny rastu a ďalšie lokálne maximum bolo zaznamenané okolo 80tej hodiny. U kvasinky *Sporobolomyces shibatanus* nastáva okolo 120tej hodiny rastu druhé široké maximum v predĺženej stacionárnej fáze.



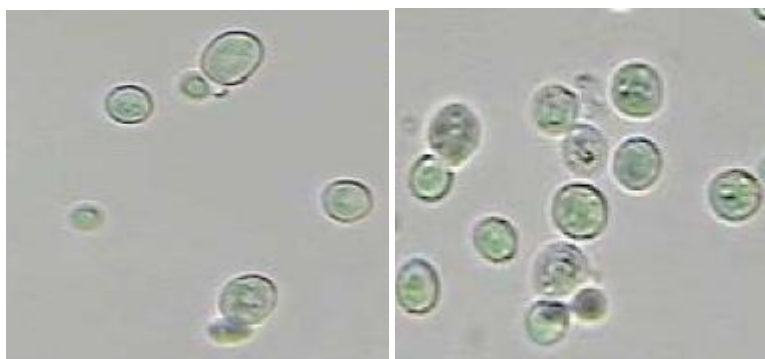
Obr. 33 Morfológia buniek *Sporobolomyces roseus* po raste v prítomnosti stresových faktorov, zľava: 2mM H_2O_2 , 5mM H_2O_2 , 2% NaCl, 5% NaCl



Obr. 34 Morfológia buniek *Sporobolomyces shibatanus* po raste v prítomnosti stresových faktorov, zľava: 2mM H_2O_2 , 5mM H_2O_2 , 2% NaCl, 5% NaCl

Vplyv stresových faktorov na tvar kvasiniek sa prejavil guľatejším tvarom stresovaných buniek na rozdiel od kontrolných buniek.

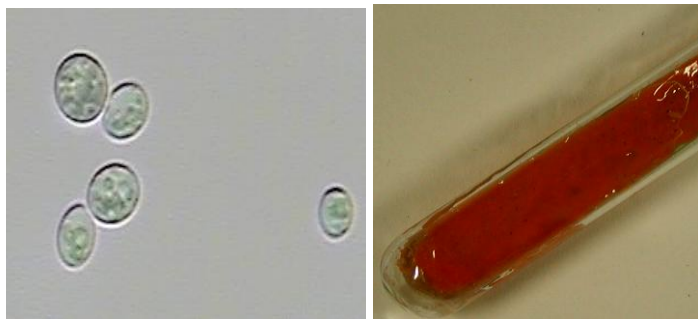
U kvasinky *Sporobolomyces shibatanus* bol prevedený test na odolnosť buniek voči lyofilizácii ako novej technike uchovávania buniek (kap. 4.2.3). Bunky po lyofilizácii boli rozsuspendedované vo fyziologickom roztoku a zmeny morfológie boli sledované mikroskopicky.



Obr. 35 Kvasinka *S. shibatanus* pred lyofilizáciou (vľavo) a po oživení zlyofilizovanej kultúry (vpravo)

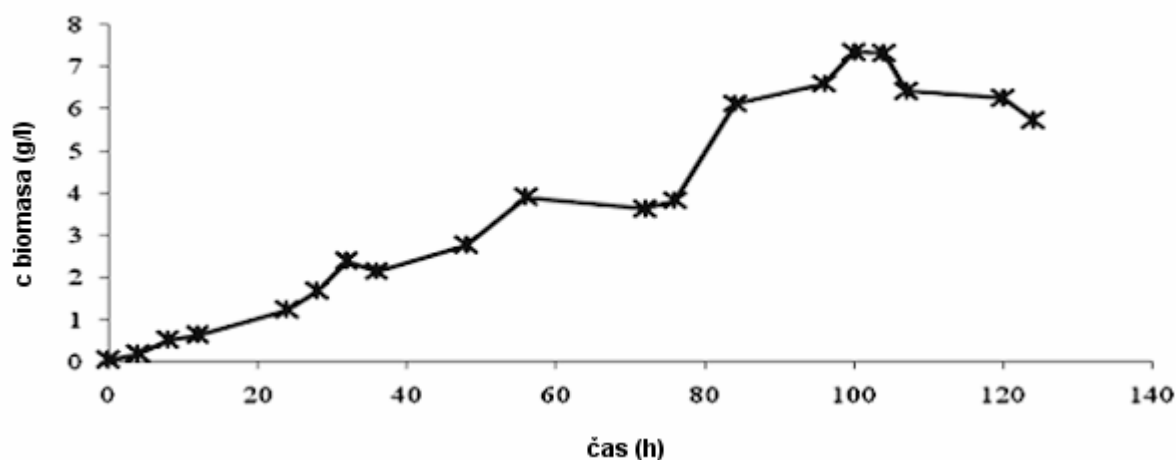
Ako je vidieť na Obr. 35, tak lyofilizácia významne neovplyvňuje morfológiu kvasinky *Sporobolomyces shibatanus*. Lyofilizované bunky boli podrobené aj rastu za štandardných podmienok, pričom rast bol porovnateľný s rastom kultúry uchováanej tradičným spôsobom na šikmom agar.

5.1.1.4 *Cystofilobasidium capitatum*



Obr. 36 Morfológia kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* a ukážka náteru na agare

Bunky kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* patria rovnako ako rod *Rhodotorula* do čeľade *Rhodotorulaceae*. Bunky sú guľaté až mierne oválne. Dochádza k hromadeniu pigmentov na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány. Náter je oranžový až ružový.



Graf 7 Rastová krivka u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*

Aj rastová krivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* má dvojstupňový charakter, tak ako ostatné vyššie spomínané kmene. Prvé maximum rastu je okolo 60-tej hodiny, čiže na konci exponenciálnej fázy rastu, druhé maximum potom okolo 105-tej hodiny rastu, tj v predĺženej stacionárnej fáze. V dobe rastu sa kmeň *Cystofilobasidium capitatum* líši od ostatných karotenogénnych kmeňov, ktoré majú maximálnu produkciu biomasy a karotenoidov už okolo 80-tej hodiny.

Tab. 21 Súhrnná tabuľka produkcie biomasy u všetkých študovaných kmeňov (80h kultivácia)

stresový faktor	<i>R.glutinis</i>	<i>R.rubra</i>	<i>R.aurantiaca</i>	<i>S.salmonicolor</i>	<i>S.roseus</i>	<i>S.shibatanus</i>	<i>C.capitatum</i>
biomasa (g/l)							
kontrola	10,09	9,53	4,69	5,83	9,04	3,58	8,04
2%NaCl	9,23	8,09	6,11	4,14	3,30	2,82	8,18
2mMH ₂ O ₂	8,41	6,76	4,63	3,13	3,32	2,39	6,86
5% NaCl	10,30	6,09	7,02	5,08	3,68	3,95	7,98
5mMH ₂ O ₂	7,21	7,94	6,77	1,95	3,89	2,85	8,39

Podľa údajov v Tab. 21 je možné porovnať produkciu biomasy u všetkých sledovaných kmeňov. Uvedené sú hodnoty množstva biomasy, ktorá bola získaná kultiváciou za štandardných podmienok. Tiež je možné porovnať produkciu biomasy po aplikácii stresových faktorov. Najvyššia produkcia biomasy bola zaznamenaná u kmeňa *Rhodotorula glutinis* (kultivácia za štandardných podmienok). Hodnoty biomasy získanej za stresových podmienok boli porovnateľné s hodnotami z kontroly, a to u všetkých kmeňov. Znamená to, že bunky boli dobre adaptované na vplyv stresových faktorov a boli schopné produkcie, ktorá je porovnateľná s kultiváciou v štandardných podmienkach.

5.1.2 Analýza proteómu kvasinkových mikroorganizmov metódou 1D PAGE-SDS

Proteóm každého organizmu je dynamický systém. Tento systém je odrazom životného prostredia, v ktorom sa organizmus nachádza, reaguje na vnútorné aj vonkajšie podnety, vplyvajú naň posttranslačné zmeny a iné modifikácie. Z toho vyplýva, že každá aj malá zmena životných podmienok sa prejaví na zmene proteínového zloženia. Kvasinkové organizmy skúmané v tejto práci boli ovplyvňované prídavnými látkami v živnom médiu, s cieľom zvýšiť produkciu vybraných metabolitov (karotenoidov) za účelom priemyselného využitia. Aplikácia exogénnych stresových faktorov v živnom médiu vyvoláva zmeny proteómu, ktoré boli pozorované najprv pomocou 1D elektroforéz a neskôr aj pomocou 2D elektroforéz s detekciou vybraných spotov proteínov pomocou MS (kap. 5.1.4). Na analýzy boli použité karotogénne kvasinkové kmene (kap. 4.1.1).

K analýze všetkých proteínov boli používané štandardné proteínové zmesi, na základe ktorých bola určovaná orientačná molekulová hmotnosť separovaných bielkovín. Zloženie zmesí je uvedené v nasledovnej tabuľke.

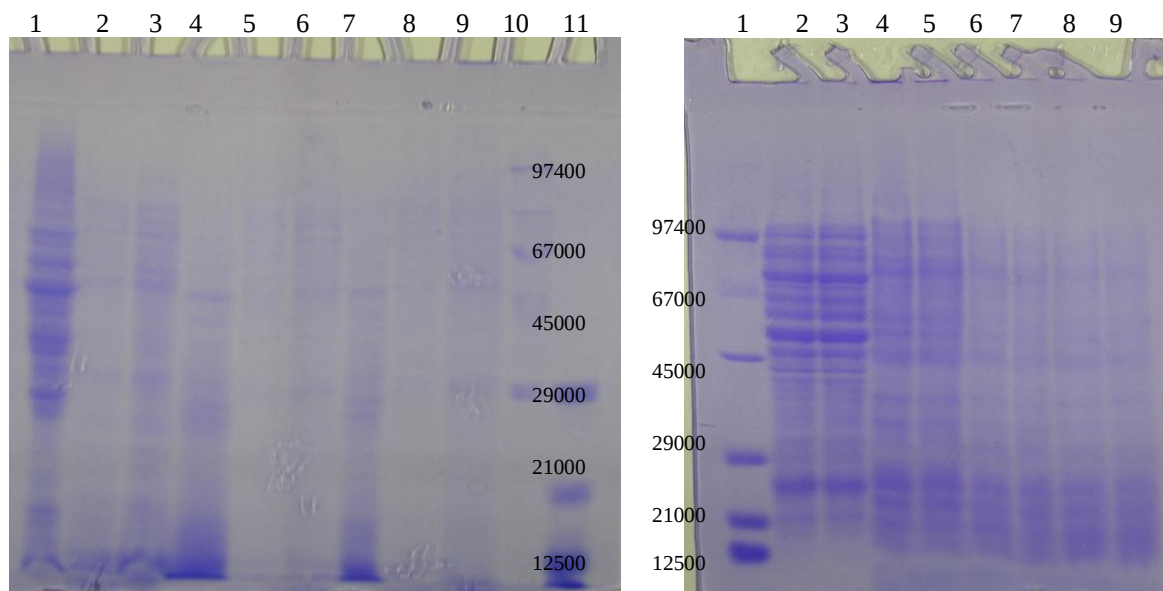
Tab. 22 Zloženie štandardných proteínových zmesí

Použitý štandard	Zloženie štandardu	Molekulová hmotnosť (Da)
Proteínová zmes 4	fosforyláza B	97,400
	hovädzí albumín	67,000
	vaječný albumín	45,000
	karboanhydráza	29,000
Proteínová zmes 5	karboanhydráza	29,000
	sójový trypsín inhibítor	21,000

Proteínová zmes 6	cytochróm C	12,500
	hovädzí trypsín inhibítor	6,500
	fosforyláza B	97,400
	hovädzí albumín	67,000
	vaječný albumín	45,000
	karboanhydráza	29,000
	sójový trypsín inhibítor	21,000
	cytochróm C	12,500
	hovädzí trypsín inhibítor	6,500

5.1.2.1 Optimalizácia izolačných podmienok

Súčasťou práce bola optimalizácia izolačných techník pre analýzu proteínov, ktorá predchádzala hlavným analýzám proteínového zloženia kvasiniek. Keďže na 1D analýzu proteínov z karotenogénnych kvasiniek nestačila bežná metóda prípravy vzoriek, ktorá je účinná na dostatočnú separáciu proteínov z iných druhov kvasiniek, napr. zo *S. cerevisiae* [121], museli byť testované iné metódy. Popisy jednotlivých optimalizačných metód sú v kapitole 4.3.1.1. Popis metód, ktoré boli následne používané na všetky analýzy, je v kapitolách 4.3.1.2 a 4.3.1.3.



Obr. 37 1D elektroforéza bielkovín z kvasiniek, izolovaných počas optimalizácie metód – vľavo výber vhodnej metódy izolácie proteínov, vpravo určenie optimálnej koncentrácie použitého NaOH

Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 65V, 100mA, 9,5 hod

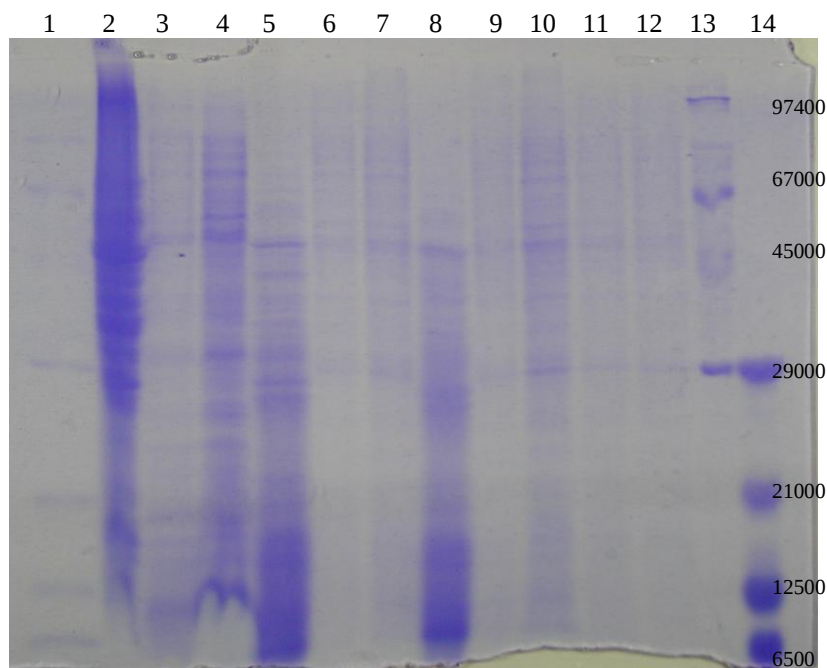
Tab. 23 Popis nanášok k Obr. 37

dráha vzorky	popis vzorky, gél vľavo	popis vzorky, gél vpravo
1	proteíny z <i>S. cerevisiae</i> , izolácia NaOH	proteínová zmes 6
2	proteíny z <i>R. glutinis</i> , izolácia NaOH	proteíny z <i>S. cerevisiae</i> , izolácia 0,2M NaOH
3	proteíny z <i>S. salmonicolor</i> , izolácia NaOH	proteíny z <i>S. cerevisiae</i> , izolácia 0,3M NaOH
4	proteíny z <i>S. cerevisiae</i> , izolácia EtOH	proteíny z <i>S. salmonicolor</i> , izolácia 0,2M NaOH
5	proteíny z <i>R. glutinis</i> , izolácia EtOH	proteíny z <i>S. salmonicolor</i> , izolácia 0,3M NaOH
6	proteíny z <i>S. salmonicolor</i> , izolácia EtOH	proteíny z <i>R. glutinis</i> , izolácia 0,2M NaOH
7	proteíny z <i>S. cerevisiae</i> , izolácia SDS + guličky	proteíny z <i>R. glutinis</i> , izolácia 0,3M NaOH
8	proteíny z <i>R. glutinis</i> , izolácia SDS + guličky	proteíny z <i>R. glutinis</i> , izolácia 0,4M NaOH
9	proteíny z <i>S. salmonicolor</i> , izolácia SDS + guličky	proteíny z <i>R. glutinis</i> , izolácia 0,4M NaOH + guličky
10	proteínová zmes 4	
11	proteínová zmes 5	

V prvom kroku bola overovaná schopnosť dostatočnej izolácie proteínov z kvasinkových mikroorganizmov. Ako modelový organizmus bola použitá kvasinka *S. cerevisiae*. Pre túto kvasinku nebol problém získať dobre viditeľné línie proteínov, ukážky separácie sú súčasťou gélov uvedených na obr.37 (lína 1 vpravo, línie 2,3 vľavo). Následne boli izolačné techniky skúšané aj na kmeňoch červených kvasiniek, konkrétne na *R. glutinis* a *S. salmonicolor*. Z experimentov vyplynulo, že najvhodnejšou metódou izolácie proteínov pre 1D elektroforézy je metóda s použitím NaOH (Obr. 37 vľavo).

Ďalším experimentom bola overená účinnosť koncentrácie použitého NaOH k izolácii proteínov z kvasinkových mikroorganizmov (Obr. 37 vpravo). Z experimentu vyplynulo, že je možné zachovanie koncentrácií podľa návodu v literatúre [103].

V ďalšom kroku bola overovaná účinnosť prídavku inhibítorov proteáz do izolačnej zmesi. Ich prídavok počas extrakcie však neovplyvnil výsledok, takže pre ďalšie experimenty v rámci 1D elektroforéz neboli používané.

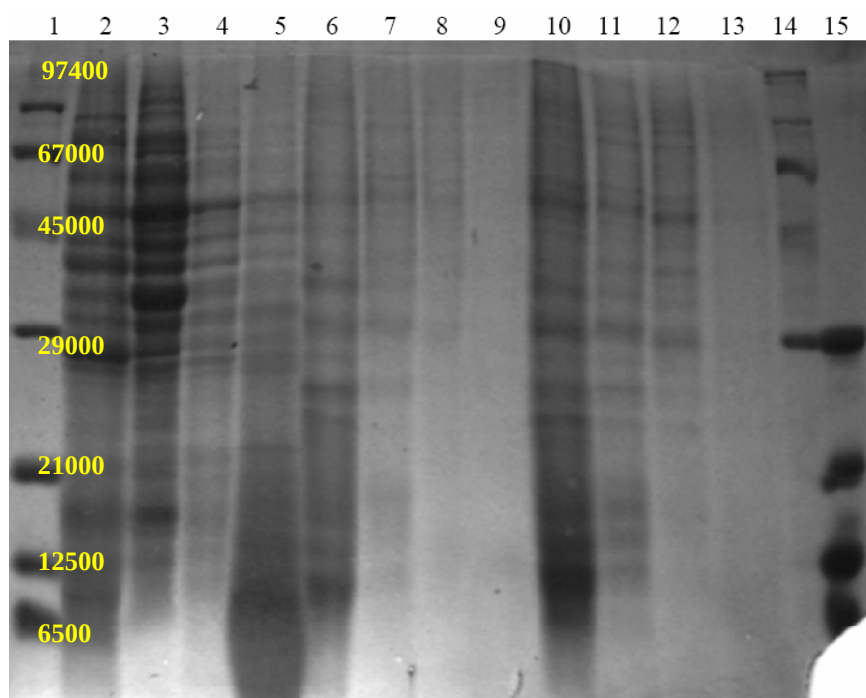


Obr. 38 1D elektroforéza bielkovín z kvasiniek, izolovaných počas optimalizácie metód, testovanie inhibítorov proteáz

Tab. 24 Popis nanášok k Obr. 38

dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteíny z <i>S.cerevisiae</i> , izolácia NaOH
3	proteíny z <i>R. glutinis</i> , izolácia NaOH
4	proteíny z <i>S. salmonicolor</i> , izolácia NaOH
5	proteíny z <i>S.cerevisiae</i> , izolácia SDS
6	proteíny z <i>R. glutinis</i> , izolácia SDS
7	proteíny z <i>S. salmonicolor</i> , izolácia SDS
8	proteíny z <i>S. cerevisiae</i> , izolácia SDS + inhibítory proteáz
9	proteíny z <i>R. glutinis</i> , izolácia SDS + inhibítory proteáz
10	proteíny z <i>S. salmonicolor</i> – izolácia SDS + inhibítory proteáz
11	proteíny z <i>R. glutinis</i> - izolácia SDS
12	proteíny z <i>R. glutinis</i> - izolácia SDS + inhibítory proteáz
13	proteínová zmes 4
14	proteínová zmes 5

V prvých experimentoch neboli v metóde s NaOH používané sklenené guľôčky o veľkosti kvasinkových buniek. Aj v nasledujúcich experimentoch boli guľôčky použité len u vzoriek, kde sa pridávalo SDS a SDS + inhibítory proteáz. Až od ďalších experimentov boli guľôčky používané pri každej izolácii, pretože tento krok mechanickej dezintegrácie sa ukázal ako veľmi nápomocný v lýze buniek karotenogénnych kvasiniek.



Obr. 39 1D elektroforéza bielkovín z kvasiniek, izolovaných počas optimalizácie metód

Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 65V, 100mA, 9 hod

Tab. 25 Popis nanášok k Obr. 39

dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteíny z <i>S.cerevisiae</i> , izolácia NaOH, sup.
3	proteíny z <i>S.cerevisiae</i> , izolácia NaOH, sed.
4	proteíny z <i>S.cerevisiae</i> , izolácia SDS, sup.
5	proteíny z <i>S.cerevisiae</i> , izolácia SDS, sed.
6	proteíny z <i>R. glutinis</i> (lyof.), izolácia NaOH, sup.
7	proteíny z <i>R. glutinis</i> (lyof.), izolácia NaOH, sed.
8	proteíny z <i>R. glutinis</i> (lyof.), izolácia SDS, sup.
9	proteíny z <i>R. glutinis</i> (lyof.), izolácia SDS, sed.
10	proteíny z <i>R. glutinis</i> – izolácia NaOH, sup.
11	proteíny z <i>R. glutinis</i> - izolácia NaOH, sed.
12	proteíny z <i>R. glutinis</i> - izolácia SDS, sup.
13	proteíny z <i>R. glutinis</i> - izolácia SDS, sed.
14	proteínová zmes 4
15	proteínová zmes 5

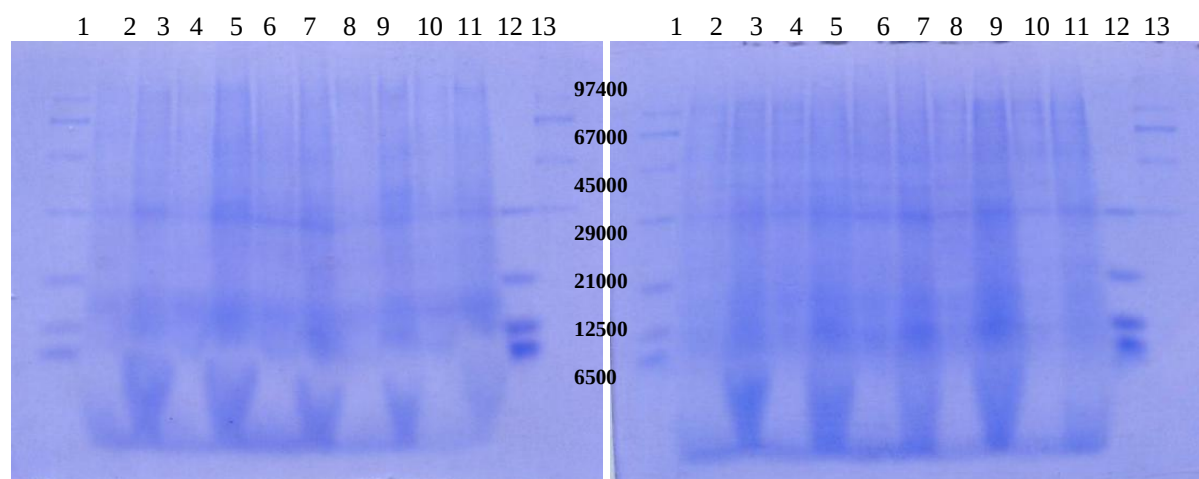
Na Obr. 39 je vidieť, že u vzoriek proteínov izolovaných zo *S. cerevisiae* pomocou metódy s NaOH (línies 2 a 3) došlo k separácii proteínov. Je vidieť silné zóny bielkovín, na základe ktorých je možné určiť približnú molekulovú veľkosť, s najväčšou pravdepodobnosťou ide však

o zmesné zóny obsahujúce viacero proteínov. Pri bielkovinách izolovaných pomocou SDS (línie 4 a 5) sú zóny slabšie. Nutné je však poznamenať, že *S. cerevisiae* ako modelový kmeň má odlišné zloženie bunkovej steny než karotenogénne kvasinky, ktoré obsahujú pravdepodobne viac komplexných lipoproteínov, a preto bola izolácia proteínov z *S.cerevisiae* jednoduchšia. U vzoriek proteínov izolovaných z *R. glutinis* (línie 6 – 13) je vidieť rozdiely v použitých metódach, ako najúčinnější sa opäť ukázala metóda s použitím NaOH. Experimenty boli prevedené v supernatantoch aj v sedimentoch, pričom je vidieť, že v priebehu dezintegrácie prechádza väčšia časť proteínov do roztoku, časť ich ale ostáva naviadaná napr. v membránach či na zvyškoch buniek v sedimente. Neúspechom sa skončila izolácia z lyofilizovaných buniek *R. glutinis* metódou SDS (línie 8 a 9), kde nie je vidieť takmer žiadne zóny proteínov. U nelyofilizovaných buniek (línie 12 a 13) dopadla izolácia lepšie, aj keď zóny proteínov nie sú tak intenzívne ako u izolácie pomocou NaOH.

Z uvedených výsledkov experimentov vyplýva, že najvhodnejšou formou izolácie proteínov z kvasinkových mikroorganizmov je metóda s použitím NaOH, ktorá sa u všetkých testovaných mikroorganizmov ukázala ako účinnejšia metóda než s použitím SDS. Aj napriek tomu boli vo všetkých izolačných experimentoch aplikované zakaždým obe techniky, aj s NaOH aj s SDS, aby ich bolo možné aj naďalej porovnávať.

5.1.2.2 *Rhodotorula glutinis*

Bunky kmeňa *Rhodotorula glutinis* boli kultivované za normálnych aj stresových podmienok (kap. 4.2.1). Následne prebehla dezintegrácia za použitia sklenených guľčiek, NaOH a SDS (kap. 4.3.1). Proteínové extrakty boli po predpríprave so vzorkovým pufrom nanesené na gél pre 1D elektroforézu (kap. 4.4.3). Na vyhodnotenie elektroforetogramov boli použité dva druhy farbenia – Coomassie Brilliant Blue a striebro.



Obr. 40 1D elektroforéza bielkovín izolovaných z kmeňa *Rhodotorula glutinis*, vľavo proteíny izolované pomocou metódy s NaOH, vpravo proteíny izolované pomocou SDS, farbenie CCB

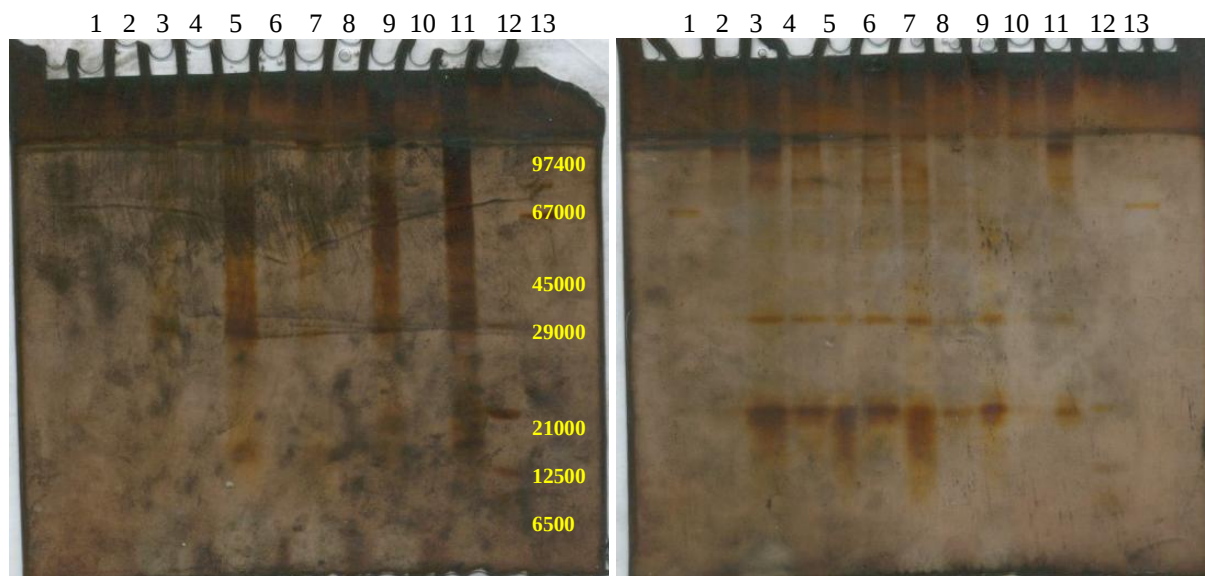
Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 60 V, 100 mA, 8 hod

Tab. 26 Popis nanášok k Obr. 40 (pozn. popisky línií v tejto tabuľke sú zhodné pre oba gély, vzorky na obr. vľavo boli izolované pomocou NaOH, vzorky vpravo boli izolované pomocou SDS)

dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteíny z <i>R.glutinis</i> , kontrola, lyof.b.
3	proteíny z <i>R.glutinis</i> , kontrola, nelyof.b.
4	proteíny z <i>R.glutinis</i> , 2%NaCl, lyof.b.
5	proteíny z <i>R.glutinis</i> , 2%NaCl, nelyof.b.
6	proteíny z <i>R.glutinis</i> , 5%NaCl, lyof.b.
7	proteíny z <i>R.glutinis</i> , 5%NaCl, nelyof.b.
8	proteíny z <i>R.glutinis</i> , 2mM H ₂ O ₂ , lyof.b.
9	proteíny z <i>R.glutinis</i> , 2mM H ₂ O ₂ , nelyof.b.
10	proteíny z <i>R.glutinis</i> , 5mM H ₂ O ₂ , lyof.b.
11	proteíny z <i>R.glutinis</i> , 5mM H ₂ O ₂ , nelyof.b.
12	proteínová zmes 5
13	proteínová zmes 4

Pri vybraných experimentoch analýzy proteínov 1D elektroforézou bola testovaná extrakcia proteínov z lyofilizovaných kvasinkových buniek, pretože bunky v tejto forme sa ukázali ako vhodné k príprave vzoriek pre 2D analýzy. Tento spôsob predprípravy materiálu sa však pre 1D analýzy neosvedčil.

Na elektroforetogramoch farbených pomocou CCB je možné identifikovať zóny proteínov o určitých molekulových hmotnostiach. Jasnejšie zóny sú v oblasti vyšších molekulových hmotností. Dobre viditeľná zóna proteínov je okolo 29 kDa. Táto metóda farbenia však nie je natoľko citlivá, aby bolo možné vidieť aj malé množstvá proteínov. Preto sa využíva aj farbenie striebrom, ktorého výhoda spočíva v tom, že má citlivosť v rovnakom rozsahu ako moderná hmotnostná spektrometria, čo robí tento druh farbenia jednou z najatraktívnejších techník vizualizácie proteínov [122]. Vplyv stresových faktorov na proteíny nie je pri 1D elektroforéze až tak viditeľný. Najlepšie proteínové profily boli okrem kontroly viditeľné u kvasiniek kultivovaných v prítomnosti 2% NaCl a 5mM H₂O₂.



Obr. 41 1D elektroforéza bielkovín izolovaných z kmeňa *Rhodotorula glutinis*, vľavo proteíny izolované pomocou metódy s NaOH, vpravo proteíny izolované pomocou SDS, farbenie striebrom (popis nanášok je rovnaký ako pri predchádzajúcom obrázku)

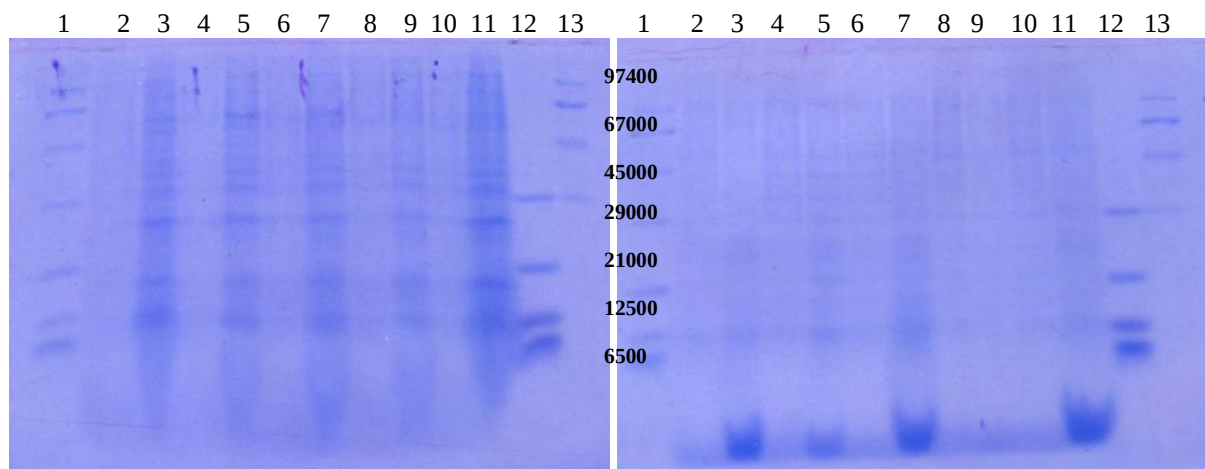
Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 60 V, 100 mA, 8 hod

V tomto prípade sa farbenie striebrom moc nevydarilo. Je potrebné však podotknúť, že metóda farbenia striebrom je veľmi citlivá, náročnejšia na prevedenie aj z časového aj z materiálneho hľadiska, pričom výsledok nie je vždy zaručený. Dobre patrná je len zóna proteínov okolo 29 kDa, ktorú bolo možné vidieť aj na Obr. 40. U proteínov izolovaných technikou s SDS (Obr. 41 vpravo) bolo možné vidieť tiež výraznú zónu proteínov okolo 21 kDa.

Keďže *Rhodotorula glutinis* je kvasinka, u ktorej sa priemyselné využitie na produkciu karotenoidov javí zatiaľ ako najviac vhodné, bolo proteínové zloženie a najmä zmeny proteómu po aplikácii stresových faktorov, sledované aj pomocou 2D elektroforézy a vybrané proteíny boli identifikované pomocou MS (kap. 5.1.4.1).

5.1.2.3 *Rhodotorula rubra*

Aj v prípade kmeňa *Rhodotorula rubra* bol podobný postup kultivácie buniek (kap. 4.2.1), izolácie proteínov (kap. 4.3.1), aj prípravy vzoriek na PAGE-SDS (kap. 4.4.3) ako u kmeňa *Rhodotorula glutinis*. Elektroforetogramy boli farbené metódou s Coomassie Brilliant Blue.



Obr. 42 1D elektroforéza bielkovín izolovaných z kmeňa *Rhodotorula rubra*, vľavo proteíny izolované pomocou metódy s NaOH, vpravo proteíny izolované pomocou SDS, farbenie CCB

Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 60 V, 100 mA, 8 hod

Tab. 27 Popis nanášok k Obr. 42 (pozn. popisky línií v tejto tabuľke sú zhodné pre oba gély, vzorky na obr. vľavo boli izolované pomocou NaOH, vzorky vpravo boli izolované pomocou SDS)

dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteíny z <i>R.rubra</i> , kontrola, lyof.b.
3	proteíny z <i>R.rubra</i> , kontrola, nelyof.b.
4	proteíny z <i>R.rubra</i> , 2%NaCl, lyof.b.
5	proteíny z <i>R.rubra</i> , 2%NaCl, nelyof.b.
6	proteíny z <i>R.rubra</i> , 5%NaCl, lyof.b.
7	proteíny z <i>R.rubra</i> , 5%NaCl, nelyof.b.
8	proteíny z <i>R.rubra</i> , 2mM H ₂ O ₂ , lyof.b.
9	proteíny z <i>R.rubra</i> , 2mM H ₂ O ₂ , nelyof.b.
10	proteíny z <i>R.rubra</i> , 5mM H ₂ O ₂ , lyof.b.
11	proteíny z <i>R.rubra</i> , 5mM H ₂ O ₂ , nelyof.b.
12	proteínová zmes 5
13	proteínová zmes 4

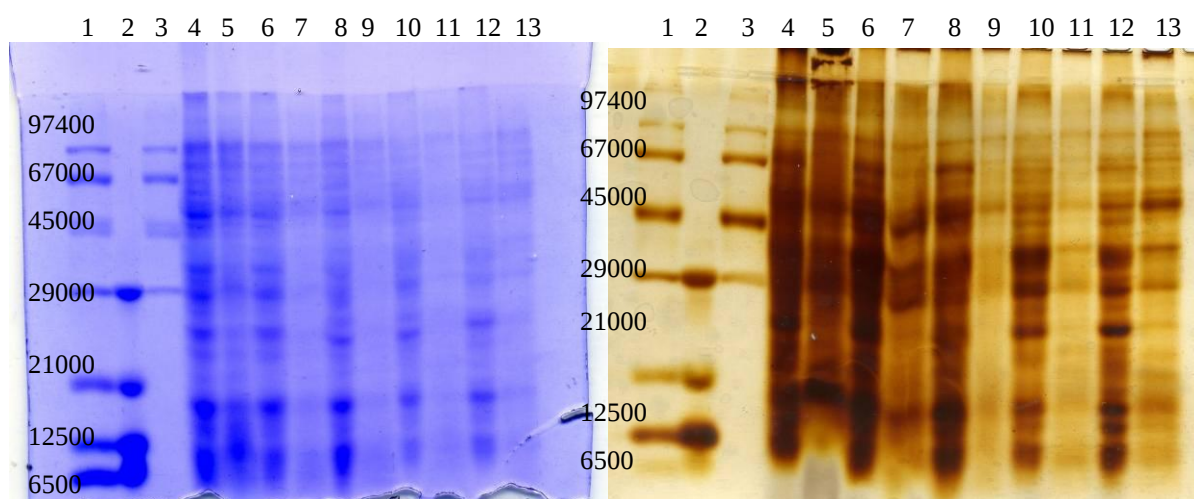
Experiment bol viackrát opakovaný, najlepšie výsledky sú zverejnené na Obr. 42.

Tak ako u kvasinky *Rhodotorula glutinis*, aj u *Rhodotorula rubra* bola testovaná extrakcia proteínov z lyofilizovaných kvasinkových buniek pre následnú analýzu 1D elektroforézou. Aj v tomto prípade sa úprava buniek lyofilizáciou ukázala ako horšia alternatíva, pretože proteínové profily boli lepšie viditeľné u buniek, ktoré neprešli lyofilizáciou. Čo sa týka použitej metódy, tak aj v tomto prípade sa ako vhodnejšia ukázala izolácia pomocou NaOH (Obr. 42, vľavo), pri použití ktorej bolo možné orientačne určiť molekulovú hmotnosť u väčšieho množstva proteínov,

než pri metóde izolácie pomocou SDS. Zóny proteínov sú viditeľné v oblastiach okolo 67 kDa, 45 kDa, 29 kDa, 18 kDa a 10 kDa. Môže sa jednať o HSP proteíny. Najviac viditeľné boli proteíny u kontrolnej vzorky a u 5mM H₂O₂. Zaznamenanie proteínových profilov pomocou 2D elektroforézy a identifikácia vybraných proteínov pomocou MS boli prevedené aj u tejto kvasinky (kap. 5.1.4.2).

5.1.2.4 *Rhodotorula aurantiaca*

Bunky kmeňa *Rhodotorula aurantiaca* boli podrobené kultivácii za normálnych aj stresových podmienok (kap. 4.2.1). Následne prebehla dezintegrácia za použitia sklenených guľčiek, NaOH a SDS (kap. 4.3.1). Proteínové extrakty boli po predpríprave so vzorkovým pufrom nanesené na gél pre 1D elektroforézu (kap. 4.4.3). Na vyhodnotenie elektroforetogramov boli použité dva druhy farbenia – Coomassie Brilliant Blue a striebro.



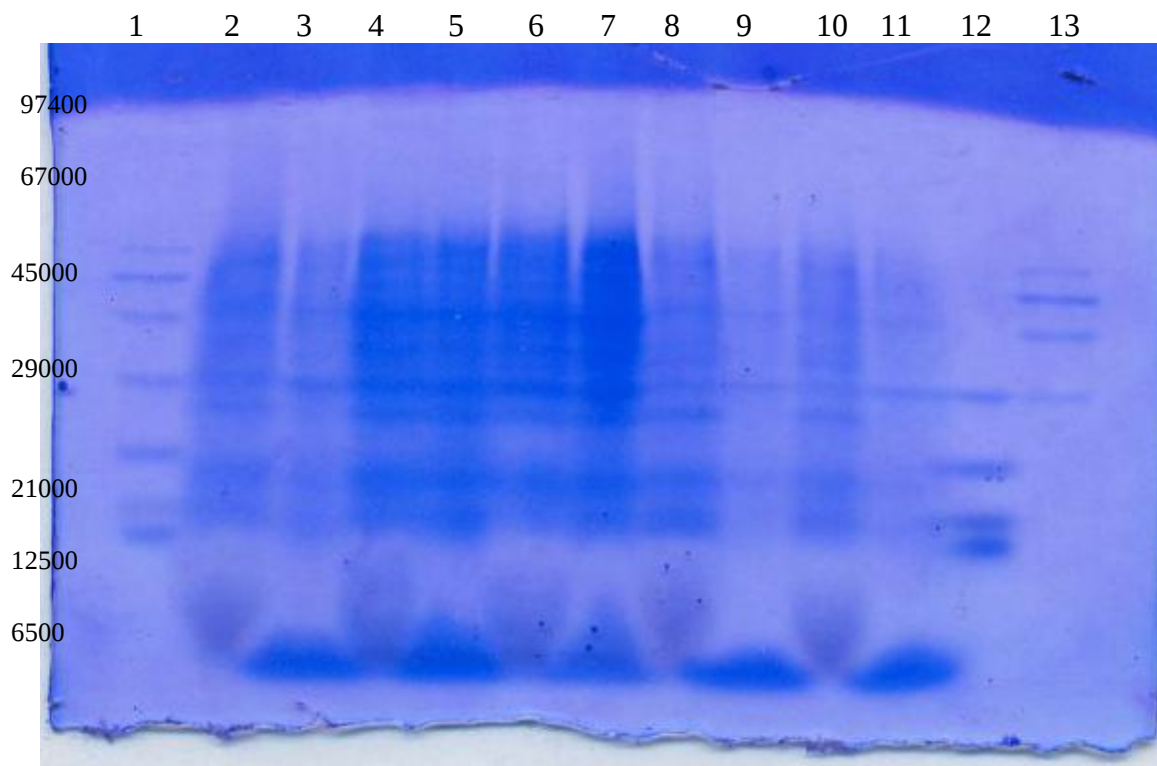
Obr. 43 1D elektroforéza bielkovín izolovaných z kmeňa *Rhodotorula aurantiaca*, vľavo farbenie CCB, vpravo farbenie striebrom

Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 65 V, 100 mA, 9 hod

Tab. 28 Popis nanášok ku Obr. 43

dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteínová zmes 5
3	proteínová zmes 4
4	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - kontrola, izolácia NaOH
5	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - kontrola, izolácia SDS
6	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
7	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - 5 mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
8	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
9	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - 2mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS

10	proteíny z <i>R. arantiaca</i> – 5% NaCl, izolácia NaOH
11	proteíny z <i>R. arantiaca</i> – 5% NaCl, izolácia SDS
12	proteíny z <i>S.shibatanus</i> – 2% NaCl, izolácia NaOH
13	proteíny z <i>R. arantiaca</i> – 2% NaCl, izolácia SDS



Obr. 44 1D elektroforéza bielkovín izolovaných z kmeňa *Rhodotorula aurantiaca*, farbenie CCB

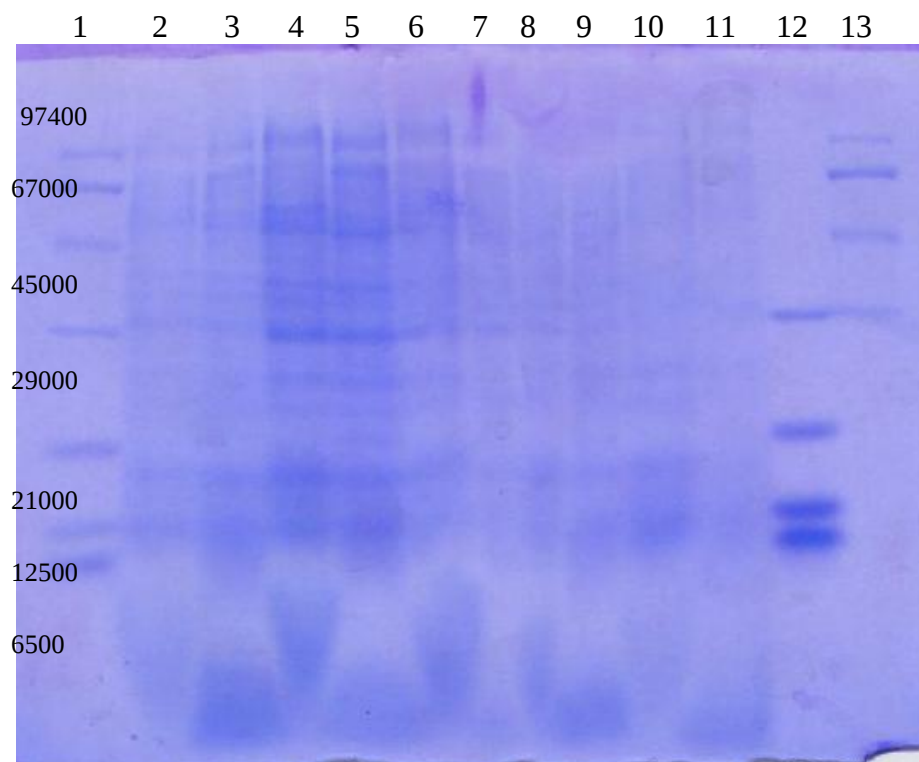
Tab. 29 Popis nanášok k Obr. 44

dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - kontrola, izolácia NaOH
3	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - kontrola, izolácia SDS
4	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> – 2% NaCl, izolácia NaOH
5	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - 2% NaCl, izolácia SDS
6	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - 5% NaCl izolácia NaOH
7	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - 5% NaCl, izolácia SDS
8	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
9	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
10	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
11	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
12	proteínová zmes 5
13	proteínová zmes 4

Z kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* boli získané veľmi pekné proteínové profily, najmä z analýzy na Obr. 43. Aj v tomto prípade bola vhodnejšie na izoláciu použitie NaOH, ktoré prinieslo u kontroly aj u stresovaných vzoriek dobre viditeľné proteínové profily. Mimoriadne vydarené bolo v tomto prípade farbenie striebrom (Obr. 43, vpravo), kde je vidieť zóny bielkovín v celom rozsahu molekulovej hmotnosti, a to u všetkých vzoriek, bez rozdielu použitého druhu izolácie. Malou nevýhodou sa ukázala vysoká citlivosť tejto metódy, pretože najmä u kontroly (obe izolácie, línie 4,5) a u solných stresov izolovaných s NaOH (lína 6) zóny splývajú dokopy. Vyvíjanie gélu bolo totiž ponechané po dlhšiu dobu, aby bolo možné vidieť proteíny aj u ostatných menej výrazných vzoriek. To spôsobilo splynutie zón u vzoriek s vyšším obsahom proteínov. Výhodou sú však pekné proteínové profily u vzoriek s H₂O₂ (línies 10 – 13).

5.1.2.5 *Sporobolomyces salmonicolor*

Aj proteíny z kvasiniek rodu *Sporobolomyces* boli podrobené separácii pomocou 1D elektroforézy. Ako prvý bol analyzovaný kmeň *Sporobolomyces salmonicolor*, ktorého bunky boli použité už v prvých testoch pri overovaní separačných metód. Aj v tomto prípade boli použité kontrolné bunky aj bunky vystavené vplyvu osmotického a oxidačného stresu v produkčnom živnom médiu (kap. 4.2.1). Dezintegrácia (kap. 4.3.1) prebehla za rovnakých podmienok ako u ostatných doteraz popísaných kmeňov. Proteínové extrakty boli po predpríprave so vzorkovým pufrom nanesené na gél pre 1D elektroforézu (kap. 4.4.3). Na vyhodnotenie elektroforetogramov bolo použité farbenie s Coomassie Brilliant Blue.



Obr. 45 Elektroforéza bielkovín izolovaných zo *Sporobolomyces salmonicolor*, farbenie CCB

Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 65 V, 100 mA, 8 hod

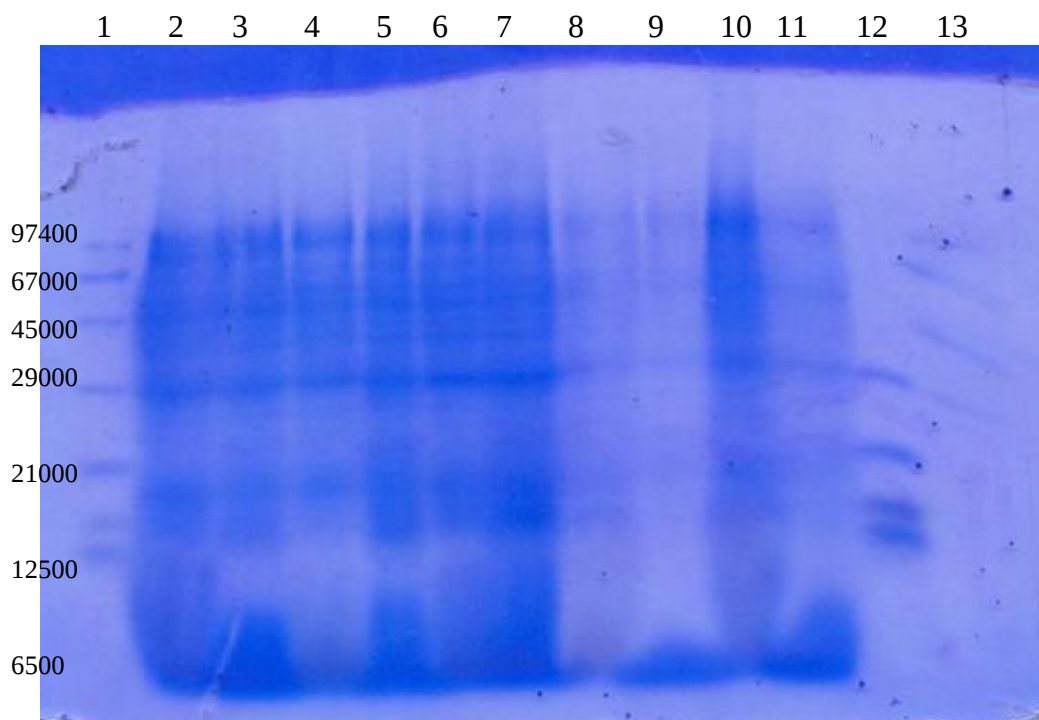
Tab. 30 Popis nanášok k Obr. 45

dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteíny z <i>S.salmonicolor</i> - kontrola, izolácia NaOH
3	proteíny z <i>S.salmonicolor</i> - kontrola, izolácia SDS
4	proteíny z <i>S.salmonicolor</i> – 2% NaCl, izolácia NaOH
5	proteíny z <i>S.salmonicolor</i> - 2% NaCl, izolácia SDS
6	proteíny z <i>S.salmonicolor</i> - 5% NaCl, izolácia NaOH
7	proteíny z <i>S.salmonicolor</i> - 5% NaCl, izolácia SDS
8	proteíny z <i>S.salmonicolor</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
9	proteíny z <i>S.salmonicolor</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
10	proteíny z <i>S.salmonicolor</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
11	proteíny z <i>S.salmonicolor</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
12	proteínová zmes 5
13	proteínová zmes 4

Izolácia proteínov z kvasinky *Sporobolomyces salmonicolor* bola prevedená prvýkrát už počas optimalizačných metód (kap. 5.1.2.1). Pri opakovanej analýze sa ukázalo, že najlepšie boli separované proteíny z 2% NaCl (línie 4, 5) a potom z 5% NaCl (línie 6, 7). Slabšie je viditeľná kontrola (línie 2, 3) a úplne nepatrné sú línie proteínov u oxidačných stresov (línie 8 – 11). U tejto kvasinky došlo k zvláštnemu výsledku – obe izolačné techniky priniesli zhodné výsledky. V tomto prípade je možné použiť teda oba druhy izolácie, aj NaOH aj SDS.

5.1.2.6 *Sporobolomyces roseus*

Bunky kvasinky *Sporobolomyces roseus* aj ich stresové variácie boli kultivované ako ostatné doteraz popísané kmene (kap. 4.2.1). Dezintegrácia (kap. 4.3.1) prebehla s použitím NaOH a SDS. Proteínové extrakty boli po predpríprave so vzorkovým pufrom nanesené na gél pre 1D elektroforézu (kap. 4.4.3). Na vyhodnotenie elektroforetogramov bolo použité farbenie s Coomassie Brilliant Blue.



Obr. 46 Elektroforéza bielkovín izolovaných zo *Sporobolomyces roseus*, farbenie CCB

Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 60 V, 100 mA, 8 hod

Tab. 31 Popis nanášok k Obr. 46

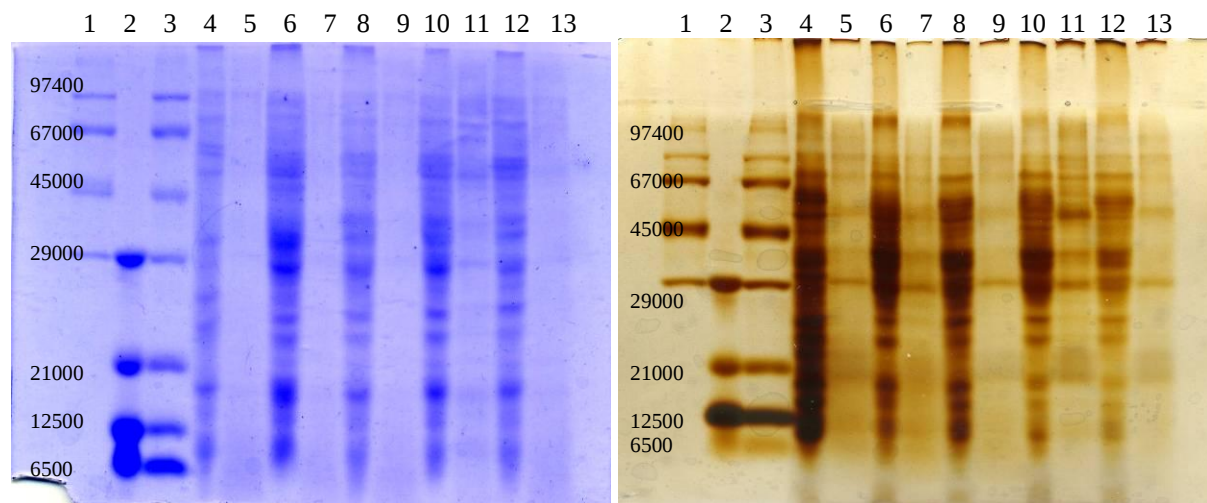
dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteíny z <i>S. roseus</i> - kontrola, izolácia NaOH
3	proteíny z <i>S. roseus</i> - kontrola, izolácia SDS
4	proteíny z <i>S. roseus</i> – 2% NaCl, izolácia NaOH
5	proteíny z <i>S. roseus</i> - 2% NaCl, izolácia SDS
6	proteíny z <i>S. roseus</i> - 5% NaCl izolácia NaOH
7	proteíny z <i>S. roseus</i> - 5% NaCl, izolácia SDS
8	proteíny z <i>S. roseus</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
9	proteíny z <i>S. roseus</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
10	proteíny z <i>S. roseus</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
11	proteíny z <i>S. roseus</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
12	proteínová zmes 5
13	proteínová zmes 4

Proteíny z kvasinky *Sporobolomyces roseus* sú na géle relatívne dobre viditeľné. Pomer proteínov bol u kontroly (línie 2,3) a solných stresov (línie 4 – 7) cca rovnaký, bez rozdielu u oboch izolačných techník. U 2mM H₂O₂ (línie 8,9) sú vzorky menej viditeľné a to u oboch použitých metód izolácie. U 5mM H₂O₂ bola ako vhodnejšia metóda izolácie vyhodnotená

metóda s použitím NaOH (lína 10). Celkovo je viac proteínov rozoznateľných pri vyšších molekulových hmotnostiach, tj v rozmedzí 29 - 97 kDa.

5.1.2.7 *Sporobolomyces shibatanus*

Rovnaké podmienky rastu (kap. 4.2.1), izolácie (kap. 4.3.1) aj 1D elektroforézy (kap. 4.4.3) ako u predchádzajúcich kmeňov boli použité aj u kmeňa *Sporobolomyces shibatanus*. Elektroforetogramy boli farbené s Coomassie Brilliant Blue a striebrom.



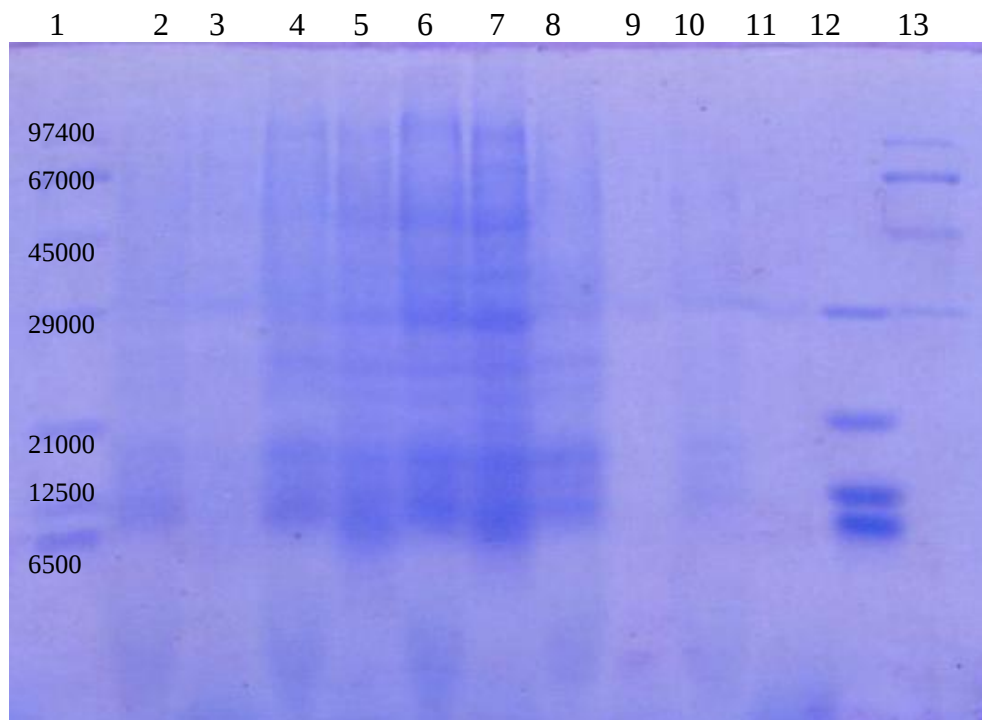
Obr. 47 Elektroforéza bielkovín izolovaných zo *Sporobolomyces shibatanus*, vľavo farbenie CCB, vpravo farbenie striebrom

Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 65V, 100mA, 9 hod

Tab. 32 Popis nanášok k Obr. 47

dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 4
2	proteínová zmes 5
3	proteínová zmes 6
4	proteíny z <i>S.shibatanus</i> - kontrola, izolácia NaOH
5	proteíny z <i>S.shibatanus</i> - kontrola, izolácia SDS
6	proteíny z <i>S.shibatanus</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
7	proteíny z <i>S.shibatanus</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
8	proteíny z <i>S.shibatanus</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
9	proteíny z <i>S.shibatanus</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
10	proteíny z <i>S.shibatanus</i> – 5% NaCl, izolácia NaOH
11	proteíny z <i>S.shibatanus</i> – 5 % NaCl, izolácia SDS
12	proteíny z <i>S.shibatanus</i> – 2 % NaCl, izolácia NaOH
13	proteíny z <i>S.shibatanus</i> – 2 % NaCl, izolácia SDS

Aj v tomto prípade boli vyizolované proteíny pekne viditeľné u všetkých vzoriek. Pri farbení s CCB (Obr. 47, vľavo) sú dobre patrné len proteíny izolované s NaOH (líníe 4, 6, 8, 10, 12). Jedná sa o kontrolu aj stresované vzorky, pričom proteíny sú viditeľné v celom rozsahu molekulových hmotností. Pri tomto farbení neboli proteíny izolované s SDS viditeľné, výnimkou je 5% NaCl (línia 12). Po zopakovaní analýzy s následným farbením striebrom (Obr. 47, vpravo) bol získaný lepší výsledok. Keďže farbenie striebrom vykazuje vyššiu citlivosť, tak boli viditeľné aj zóny proteínov po izolácii s SDS (líníe 5, 7, 9, 11, 13).



Obr. 48 Elektroforéza bielkovín izolovaných zo *Sporobolomyces shibatanus*, farbenie CCB

Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 65V, 100mA, 8 hod

Tab. 33 Popis nanášok k Obr. 48

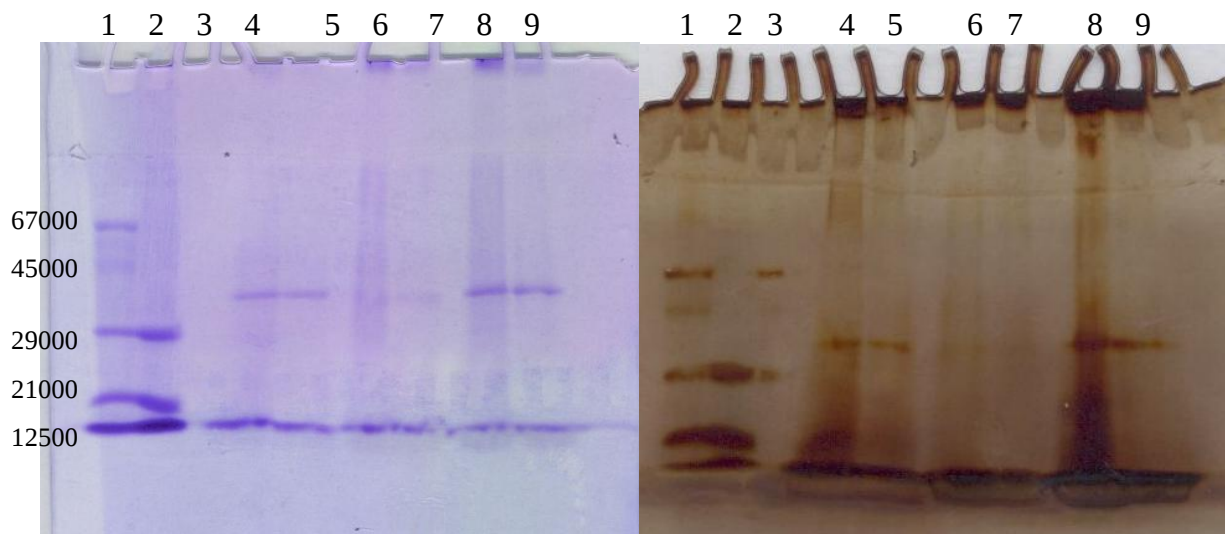
dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteíny z <i>S. shibatanus</i> - kontrola, izolácia NaOH
3	proteíny z <i>S. shibatanus</i> - kontrola, izolácia SDS
4	proteíny z <i>S. shibatanus</i> – 2% NaCl, izolácia NaOH
5	proteíny z <i>S. shibatanus</i> - 2% NaCl, izolácia SDS
6	proteíny z <i>S. shibatanus</i> - 5% NaCl izolácia NaOH
7	proteíny z <i>S. shibatanus</i> - 5% NaCl, izolácia SDS
8	proteíny z <i>S. shibatanus</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
9	proteíny z <i>S. shibatanus</i> – 2mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS

10	proteíny z <i>S. shibatanus</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
11	proteíny z <i>S. shibatanus</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
12	proteínová zmes 5
13	proteínová zmes 4

Experiment s touto kvasinkou bol po určitom čase opakovaný, ale nedošlo k tak dobrým výsledkom ako vo vyššie spomínanom prípade. Aj napriek tomu sú aspoň u niektorých vzoriek proteíny viditeľné. Prekvapivé je, že nie je vidieť takmer žiadne proteíny u kontrolnej vzorky a to ani v jednom prípade izolácie (líníe 2, 3). Aj v tomto prípade, tak ako u kmeňa *Sporobolomyces salmonicolor*, boli najlepšie viditeľné zóny proteínov u solných stresov (líníe 4 – 7). U oxidačných stresov boli lepšie viditeľné zóny pri izolácii metódou NaOH (líníe 8, 10).

5.1.2.8 *Cystofilobasidium capitatum*

Analýza proteómu kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* bola z časových dôvodov prevedená len 1x a to formou 1D elektroforézy. U tejto vzorky boli separované len bielkoviny izolované z kontrolnej vzorky, stresované bunky neboli k dispozícii. K izolácii boli použité rovnaké metódy ako u ostatných buniek, tj izolácia s použitím NaOH a SDS (kap. 4.3.1.2 a 4.3.1.3), k tomu bola otestovaná metóda izolácie pomocou TCA (kap. 4.3.1.4).



Obr. 49 Elektroforéza bielkovín izolovaných zo *Cystofilobasidium capitatum*, vľavo farbenie CCB, vpravo farbenie striebrom

Podmienky separácie pre oba gély: 12,5% PAGE gél, 65V, 100mA, 8 hod

Tab. 34 Popis nanášok k Obr. 49

dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteínová zmes 5

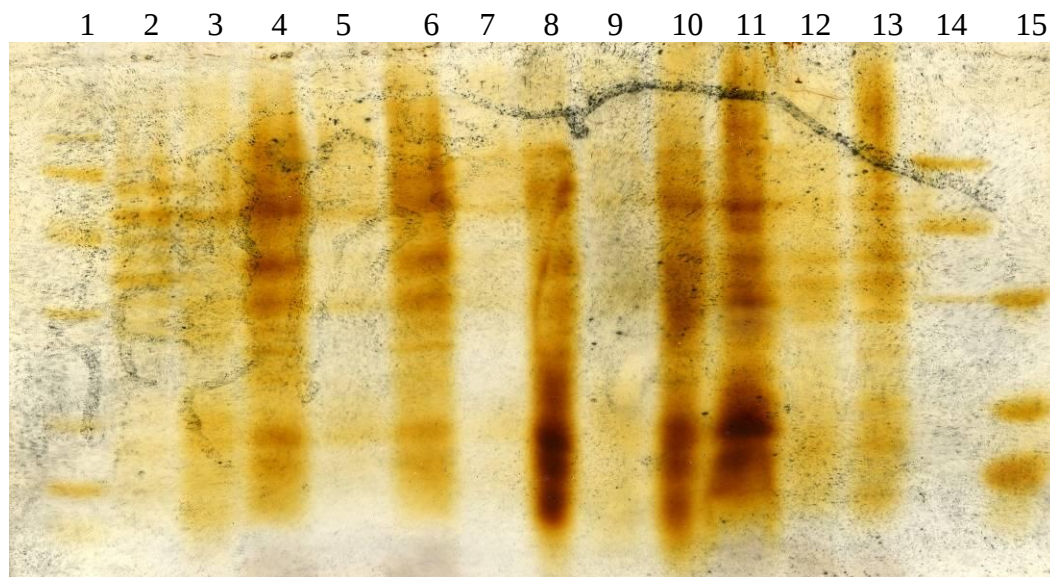
3	proteínová zmes 4
4	proteíny z <i>C. capitatum</i> - izolácia SDS (10-1-1)
5	proteíny z <i>C. capitatum</i> - izolácia SDS (10-1-2)
6	proteíny z <i>C. capitatum</i> - izolácia NaOH (10-1-1)
7	proteíny z <i>C. capitatum</i> - izolácia NaOH (10-1-2)
8	proteíny z <i>C. capitatum</i> - izolácia TCA (10-1-1)
9	proteíny z <i>C. capitatum</i> - izolácia TCA (10-1-2)

Separácia izolovaných proteínov z kvasinky *C. capitatum* nebola tak presvedčivá ako u ostatných kmeňov. Patrný je najmä proteín okolo molekulovej hmotnosti 30 – 35 kDa, ako najvhodnejšou izoláciou pre tento kmeň sa ukázalo byť použitie kyseliny trichlóroctovej (TCA).

5.1.2.9 Porovnanie proteínových profilov u všetkých testovaných kmeňov

Celkovo sa dá zo získaných 1D elektroforéz usúdiť, že proteínové profily medzi kmeňmi jednotlivých rodov sú si veľmi podobné, aj keď možnosť pozorovať zmeny proteínového zloženia pred a po aplikácii stresových faktorov je malá a lepšie výsledky podáva v tomto prípade 2D elektroforéza. Je možné vidieť rozdiely v rozložení proteínov podľa M_r medzi rodmi. Rod *Rhodotorula* má hlavné proteínové frakcie o molekulovej hmotnosti 67 kDa, 45 kDa, 35 -29 kDa, 24 kDa, 18 kDa, 15 kDa a 10 kDa. Rod *Sporobolomyces* má dominantné zóny proteínov o molekulovej hmotnosti cca 85 kDa, 60 kDa, 48 kDa, 35 kDa, 32 kDa, 24 kDa, 15 kDa a 10 kDa, pričom sa dá predpokladať, že zloženie povrchových štruktúr u *S. roseus* a *S. salmonicolor* je menej komplexné než u rodu *Rhodotorula*. Výnimku tvorí kmeň *S. shibatanus*.

Na vyhodnotenie proteínov z rodu *Cystofilobasidium* bolo málo relevantných dát, keďže chýbali na prevedenie analýzy stresované bunky, preto nie sú v elektroforetogramе zahrnuté.



Obr. 50 Porovnanie proteínových zložení testovaných kvasiniek

Tab. 35 Popis nanášok k Obr. 50

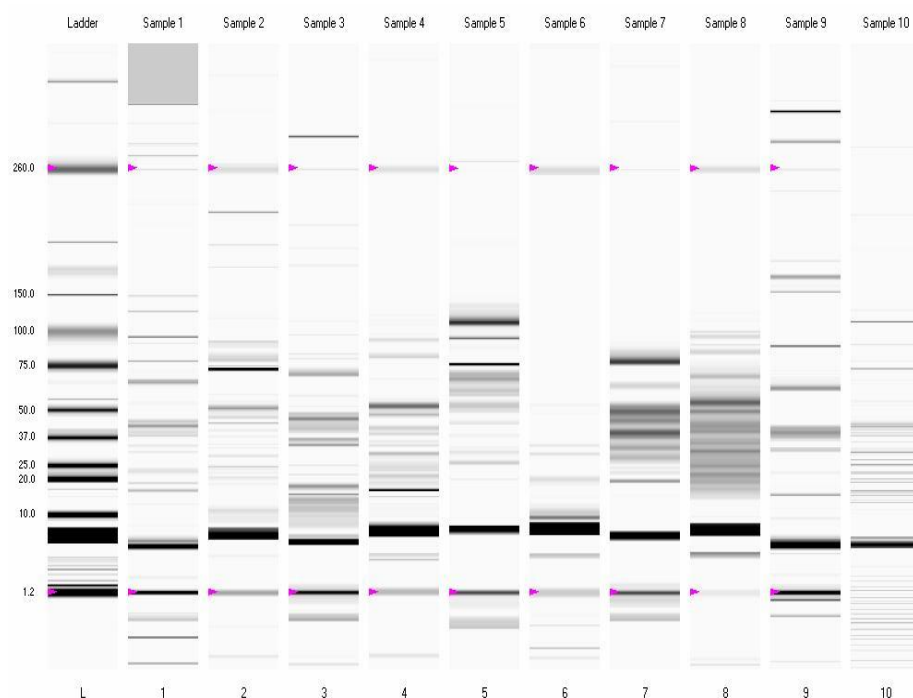
dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6
2	proteíny z <i>S. cerevisiae</i> - izolácia NaOH
3	proteíny z <i>S. cerevisiae</i> - izolácia SDS
4	proteíny z <i>S. roseus</i> –izolácia NaOH
5	proteíny z <i>S. roseus</i> - izolácia SDS
6	proteíny z <i>R. glutinis</i> - izolácia NaOH
7	proteíny z <i>R. glutinis</i> - izolácia SDS
8	proteíny z <i>S. shibatanus</i> – izolácia NaOH
9	proteíny z <i>S. shibatanus</i> – izolácia SDS
10	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> – izolácia NaOH
11	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> – izolácia SDS
12	proteíny z <i>P. rhodozyma</i> – nie je súčasťou tejto práce
13	proteíny z <i>P. rhodozyma</i> – nie je súčasťou tejto práce
14	proteínová zmes 4
15	proteínová zmes 5

5.1.3 Analýza proteómu kvasinkových mikroorganizmov metódou mikročipovej elektroforézy

Mikročipová elektroforéza, ako aktuálny trend v rýchlej separácii proteínov na základe molekulovej veľkosti, bola vybraná najmä ako metóda porovnávacia. Jej použitím sa chcela doceliť rýchla separácia proteínových extraktov z kvasiniek, avšak separačná účinnosť na takto komplexné vzorky sa ukázala ako nedostatočná, čo bude vidieť aj na nasledovných príkladoch, preto ďalej nebola používaná. Vzorky boli pripravované podľa postupov v kap. 4.3.1.5 podľa návodu popísaného v kap. 4.4.2.3.

5.1.3.1 *Rhodotorula aurantiaca*

Analýzy proteómu mikročipovou elektroforézou prebiehala u dvoch kmeňov kvasiniek, jedným u nich je *Rhodotorula aurantiaca*, ako zástupca rodu *Rhodotorula*.



Obr. 51 Mikročipová elektroforéza bielkovín izolovaných z *R. aurantiaca*

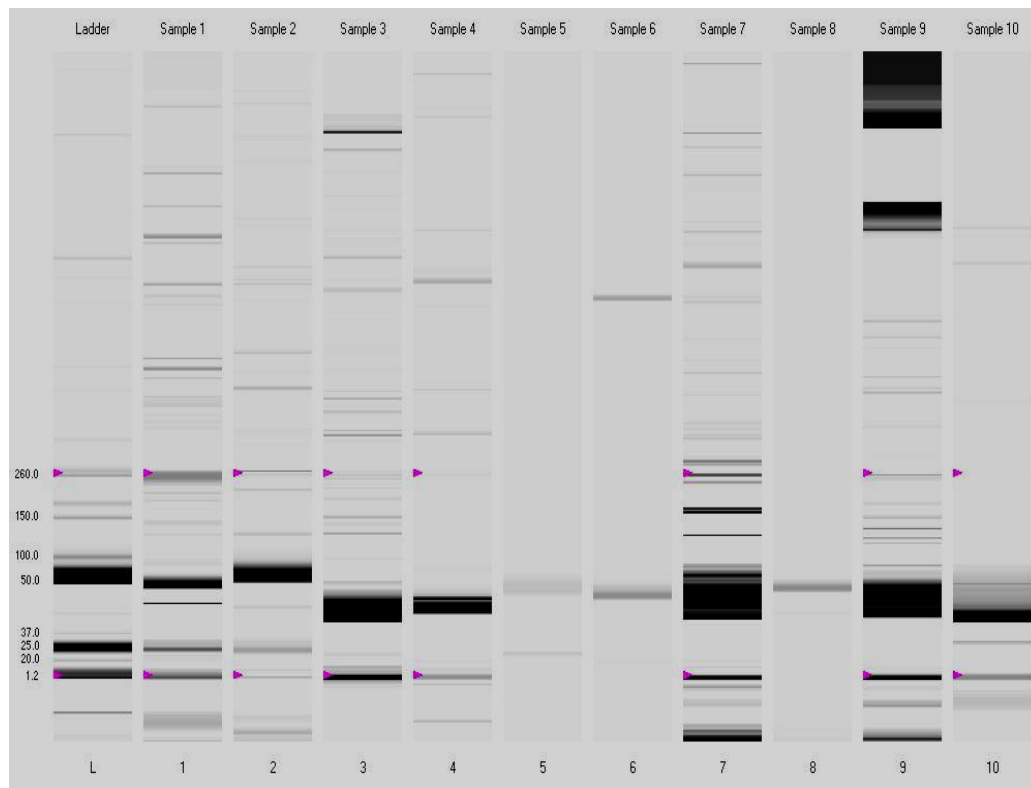
Tab. 36 Popis nanášok ku Obr. 51

dráha vzorky	popis vzorky
L	komerčný štandard pre mikročipovú analýzu
1	proteíny z <i>R. aurantica</i> - kontrola, izolácia NaOH
2	proteíny z <i>R. aurantica</i> - kontrola, izolácia SDS
3	proteíny z <i>R. aurantica</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
4	proteíny z <i>R. aurantica</i> - 5mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
5	proteíny z <i>R. aurantica</i> - 2mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
6	proteíny z <i>R. aurantica</i> - 2mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
7	proteíny z <i>R. aurantica</i> – 5% NaCl, izolácia NaOH
8	proteíny z <i>R. aurantica</i> – 5% NaCl, izolácia SDS
9	proteíny z <i>R. aurantica</i> – 2% NaCl, izolácia NaOH
10	Proteíny z <i>R. aurantica</i> – 2% NaCl, izolácia SDS

Dôležitý je pri každej mikročipovej analýze fakt, že na to, aby boli detekované odseparované proteíny, musí byť detekovaný aj proteínový štandard. Program na základe neho vypočíta automaticky molekulové hmotnosti odseparovaných proteínov. Nie je však pravidlom, že je štandard po každej analýze detekovaný. Keď detekovaný nie je, tak sa síce separácia dá vyhodnotiť, ale s obťažnosťami, pretože sa jedná len o odhad. Analýza dokumentovaná na obr.51 je príkladom separácie s detekovaným proteínovým štandardom. Nie je vidieť rozdiel medzi proteínmi izolovanými pomocou NaOH a pomocou SDS. Sú jasné majoritné zóny proteínov okolo 18 kDa.

5.1.3.2 *Sporobolomyces shibatanus*

Ako zástupca rodu *Sporobolomyces* bol mikročipovou elektroforézou analyzovaný kmeň *Sporobolomyces shibatanus*.



Obr. 52 Mikročipová elektroforéza bielkovín izolovaných z *S. shibatanus*

Tab. 37 Popis nanášok ku Obr. 52

dráha vzorky	popis vzorky
L	Proteínový štandard
1	proteíny zo <i>S.shibatanus</i> - kontrola, izolácia NaOH
2	proteíny zo <i>S.shibatanus</i> - kontrola, izolácia SDS
3	proteíny zo <i>S.shibatanus</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
4	proteíny zo <i>S.shibatanus</i> - 5mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
5	proteíny zo <i>S.shibatanus</i> - 2mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
6	proteíny zo <i>S.shibatanus</i> - 2mM H ₂ O ₂ , izolácia SDS
7	proteíny zo <i>S.shibatanus</i> – 5% NaCl, izolácia NaOH
8	proteíny zo <i>S.shibatanus</i> – 5%NaCl, izolácia SDS
9	proteíny zo <i>S.shibatanus</i> – 2%NaCl, izolácia NaOH
10	Proteíny zo <i>S.shibatanus</i> – 2% NaCl, izolácia SDS

V tomto prípade bol síce proteínový štandard tiež detekovaný, ale nie po celom rozsahu molekulovej hmotnosti, čo ovplyvňuje vyhodnotenie separácie. Je patrná zóna proteínov okolo 20 kDa a okolo 50 kDa, ale celkovému vyhodnoteniu bráni obtiažne hodnotiteľné rozdelenie vzoriek, na ktoré má vplyv tok v mikrokanaľikoch, či degradácia vzoriek a štandardov vplyvom svetla a tepla. Z výsledkov by vyplývalo, že z 2mM H₂O₂ (línie 5, 6) nebol izolovaný takmer žiadny proteín, čo pri množstve proteínov v bunke nie je reálne.

Na základe týchto analýz bola mikročipová elektroforéza naďalej využívaná prevažne na analýzu vzoriek menej komplexného charakteru (rastlinné proteíny).

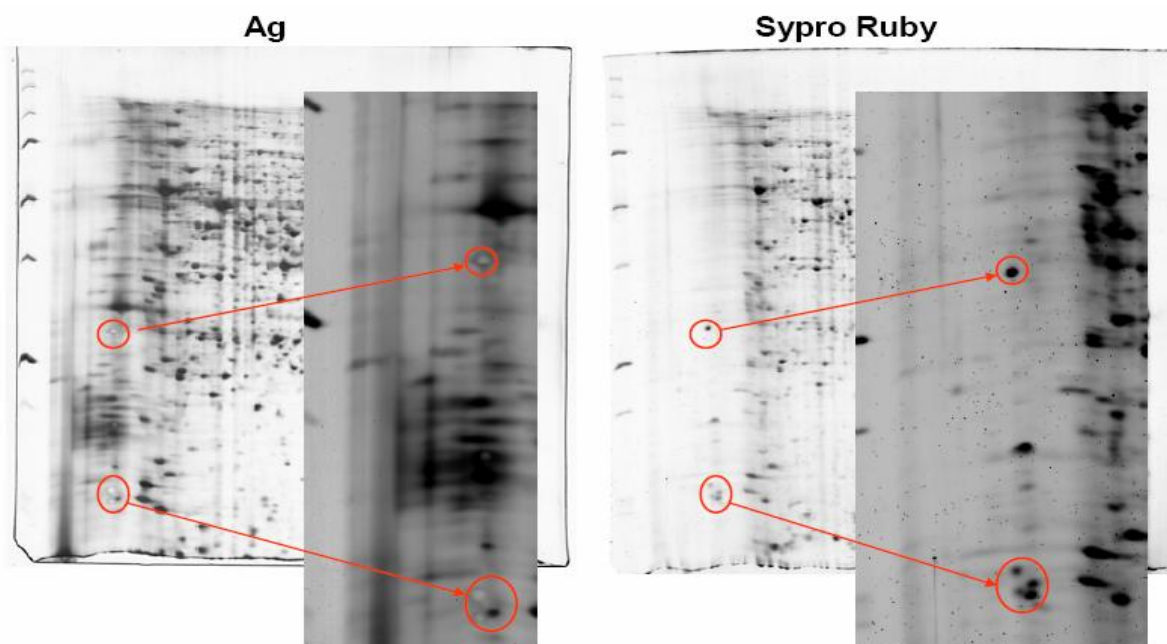
5.1.4 Analýza proteómu kvasinkových mikroorganizmov metódou 2D elektroforézy a následná identifikácia vybraných proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie

2D elektroforéza je moderný nástroj vizualizácie stoviek proteínov v čase, pričom spojenie s hmotnostnou spektrometriou vedie k ich identifikácii. Proteíny z kvasiniek majú izoelektrické body v rozmedzí od 3,1 do 12,8 a molekulové hmotnosti od 10 kDa do 470 kDa. Je preto nemožné separovať úplne všetky proteíny na jednom géle [121, 122] .

Problémom identifikácie proteínov z červených kvasiniek je najmä fakt, že tieto kmene nemajú doteraz sekvenovaný genóm. Tým pádom prevažná časť identifikácie stojí na porovnávaní s proteínmi v databázach už sekvenovaných kmeňov (ako napr. *S. cerevisiae*).

5.1.4.1 *Rhodotorula glutinis*

V rámci tejto práce bola 2D elektroforéza bielkovín prevedená prioritne u kmeňa *Rhodotorula glutinis*, keďže sa jedná o hlavný modelový kmeň. Tento kmeň preukázal najväčšiu odolnosť voči stresovým podmienkam pri produkcii biomasy a karotenoidov, pričom produkcia karotenoidov, ako bude vidieť v kapitole 5.1.5.1, preukazovala jasne zvýšené hodnoty. Analýza bola prevedená u bielkovín izolovaných zo vzoriek, ktoré neboli vystavené stresovým podmienkam – tieto vzorky boli označené ako kontrolné. Na bunky bol aplikovaný aj exogénny stres podľa návodu v kap. 4.2.1.2, čiže do produkčného média boli pridávané 2mM a 5mM peroxid vodíka a 2% a 5% NaCl. Cieľom bolo zistenie rozdielov proteínových profilov medzi proteínmi z kontrolnej vzorky a proteínmi zo stresovaných kvasiniek a ich súvislosť s metabolickými zmenami v bunkách. 2D elektroforéza (kap. 4.4.6) a MS analýzy (kap. 4.4.7) boli prevedené v spolupráci s Laboratóriom funkčnej genomiky a proteomiky Prírodovedeckej fakulty MÚ.



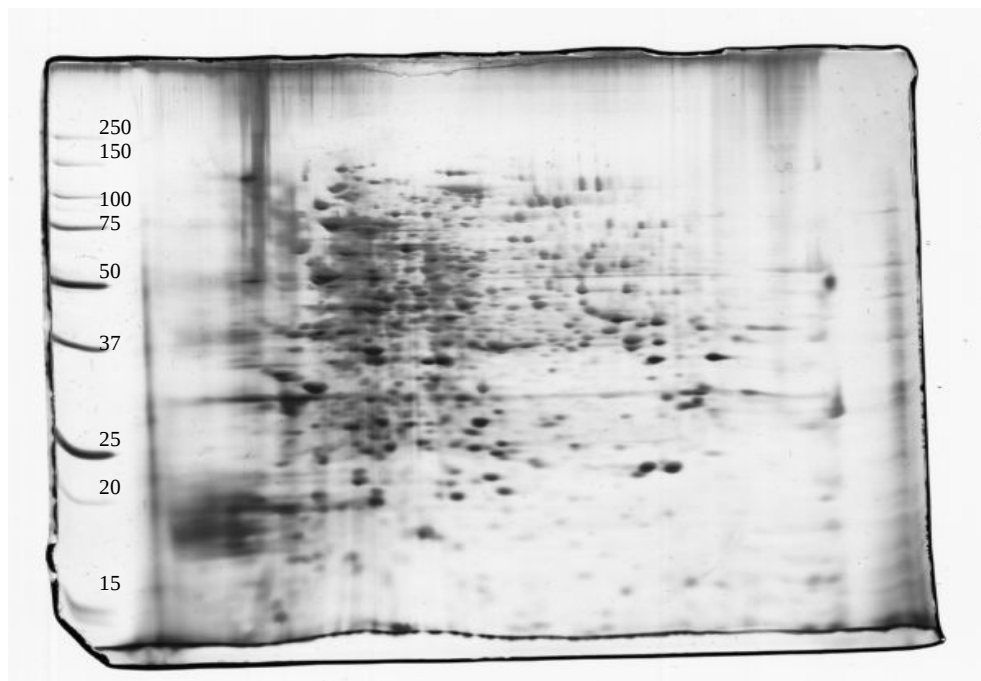
Obr. 53 Jedna z prvých 2D elektroforéz proteínov z kvasinky *Rhodotorula glutinis*, testovanie metód farbenia gélov

Prvé analýzy proteómu kvasinky *Rhodotorula glutinis* boli zamerané na overenie izolačného postupu a tiež otestovanie dvoch druhov farbenia proteínov po separácii – farbenie striebrom a farbenie fluorescenčným farbivom Sypro Ruby. Na prvotné experimenty bolo použité farbenie striebrom, a to najmä preto, že je relatívne lacné a pritom ovplyvňuje dostatočnou citlivosťou. Pre MS analýzy je však nevhodné, resp. existuje aj metóda farbenia striebrom, po ktorej môžu byť jednotlivé spoty vyrezané a analyzované, ale jedná sa opäť o náročnejšiu a na manipuláciu komplikovanejšiu metódu. Preto boli proteíny, u ktorých sa predpokladala následná analýza pomocou MS farbené farbivom Sypro Ruby, ktoré je síce drahšie, ale manipulácia s ním je jednoduchá, vizualizácia spotov je rýchla a proteíny môžu byť po vyrezaní a digescii hneď analyzované pomocou MS. Už počas prvých analýz boli urobené detailné výrezy z 2D gélov, z ktorých boli orientačne identifikované prvé proteíny. Pomocou prvotných analýz (MALDI/MS) bolo zistené, že väčšina analyzovaných spotov vykazuje prvky zmiešaných vzoriek viacerých proteínov. Po fragmentácii (MALDI/MS/MS) a porovnaní s proteínovými knižnicami bolo možné identifikovať proteíny ako analogické proteíny:

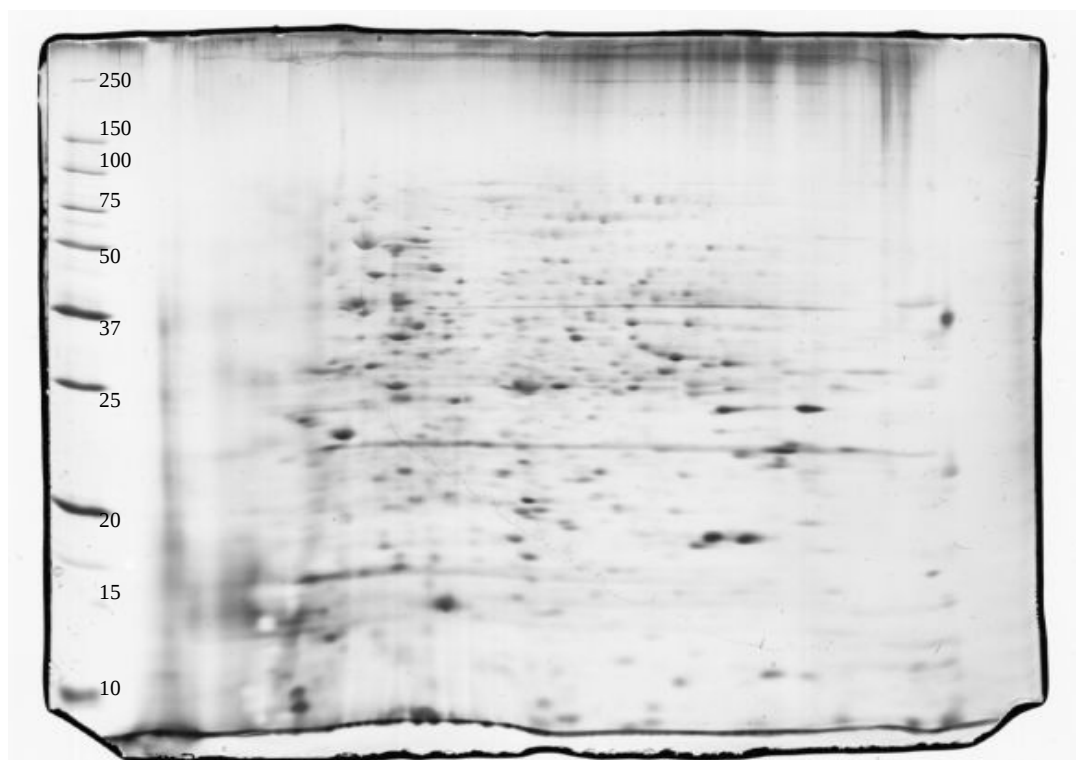
- AER184Wp [*Ashbya gossypii* ATCC10895]
- ADP/ATP carrier [*Leishmania mexicana amazonensis*]
- protein synthesis elongation factor 1-alpha [*Rhodotorula mucilaginosa*]

K identifikácii ďalších proteínov došlo počas následných analýz. Pre ukážku na nasledovných obrázkoch uvádzam ukážky výsledkov 2D analýz proteínov kvasinky *Rhodotorula glutinis*, postupne od kontrolnej vzorky, cez proteíny izolované zo stresovaných buniek.

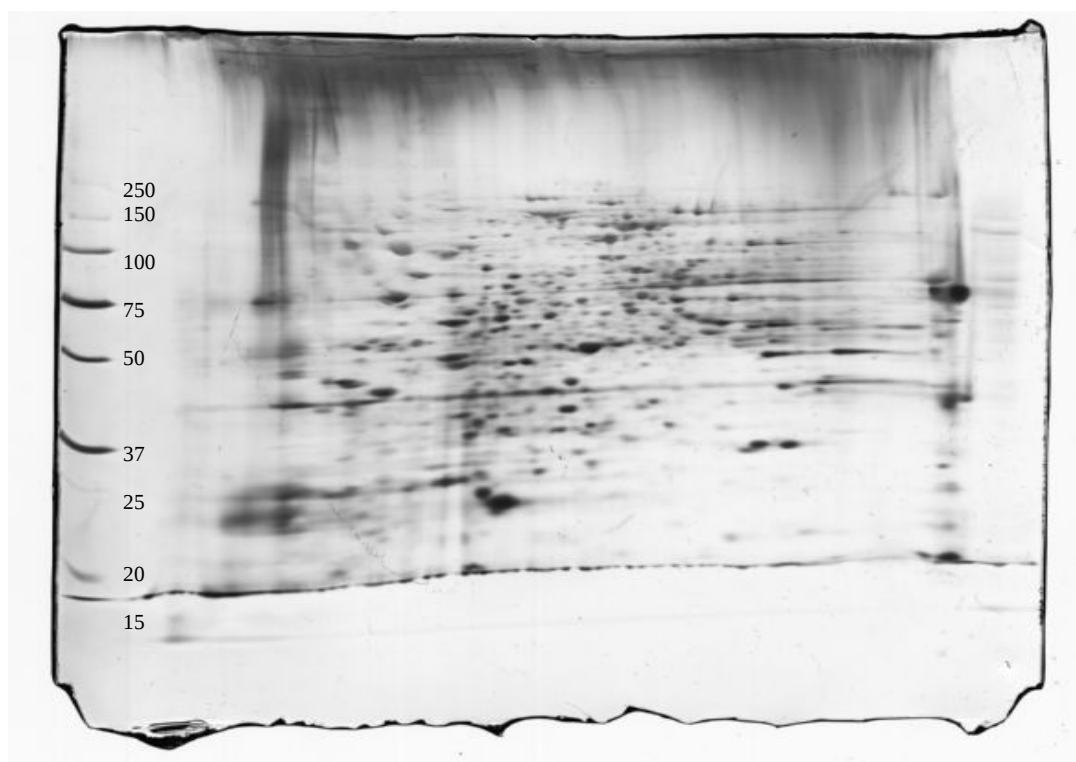
Ako proteínový štandard bol u všetkých analýz používaný Precision Plus Protein Standard (BioRad), ktorý obsahuje 10 štandardných proteínov o molekulových hmotnostiach 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, and 250 kDa.



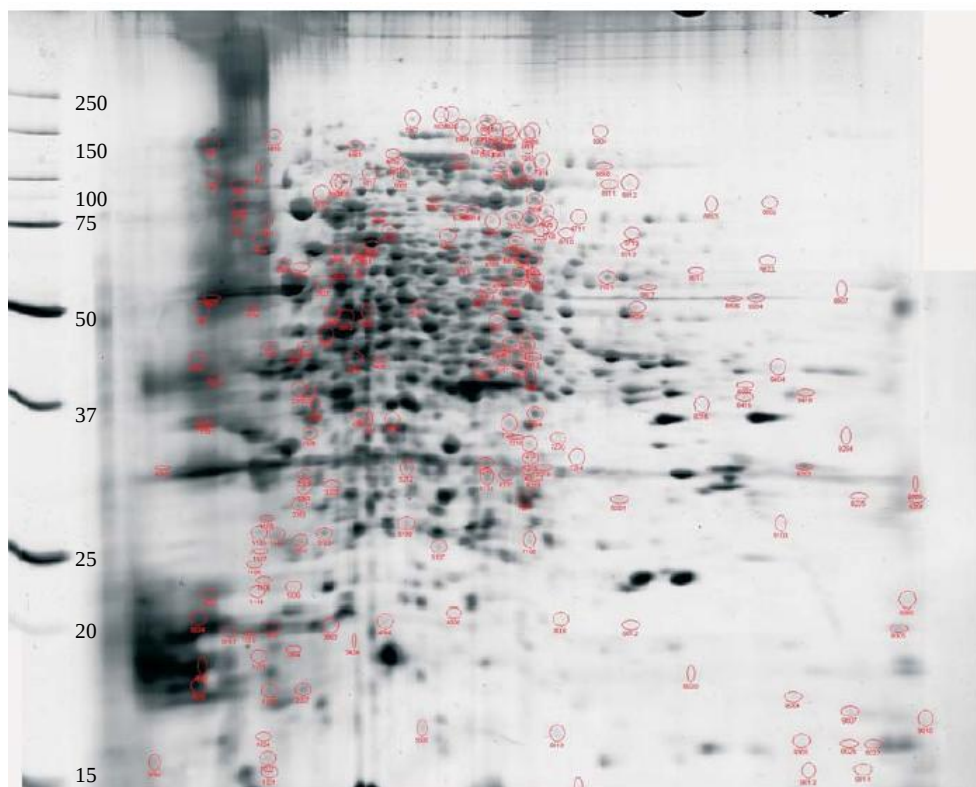
Obr. 54 2D elektroforéza bielkovín, RG – kontrola, farbenie striebrom



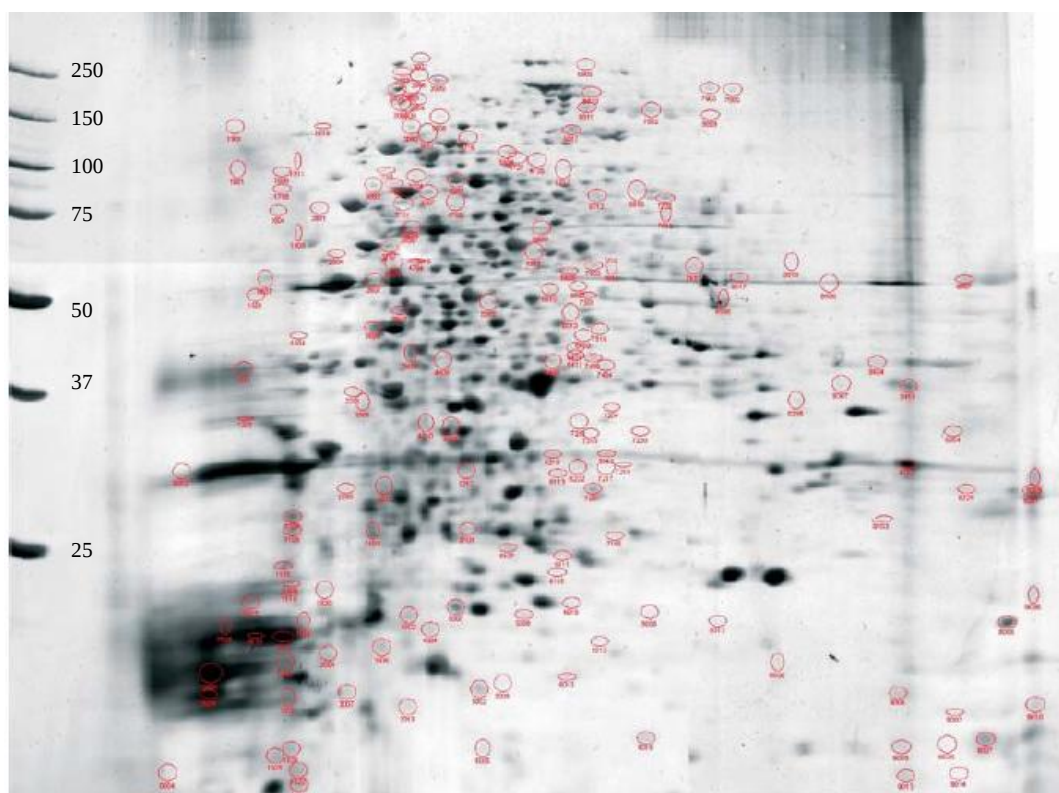
Obr. 55 2D elektroforéza bielkovín, RG – 2mM H₂O₂, farbenie striebrom



Obr. 56 2D elektroforéza bielkovín, RG – 5mM H_2O_2 , farbenie striebrom



Obr. 57 2D elektroforéza bielkovín, RG 2% NaCl, farbenie striebrom



Obr. 58 2D elektroforéza bielkovín, RG 5% NaCl, farbenie striebrom

Na základe analýz bolo možné roztriediť proteíny do troch základných skupín:

- proteíny, ktoré boli detekované len zo stresovaných buniek, ale neboli identifikované v kontrole
- proteíny, ktoré boli jasne v stave nadexpresie alebo podexpresie
- proteíny, ktorých stupeň expresie ostal nezmenený

V nasledovnej tabuľke sú rozdelené počty spotov proteínov, u ktorých došlo k nadexpresii či podexpresii v porovnaní s kontrolou a v jednom prípade došlo k porovnávaniu so slabším stresom.

Tab. 38 Kvantitatívna analýza proteínov z kvasinky *Rhodotorula glutinis*

	RG 2mM H ₂ O ₂ vs. kontrola	RG 2% NaCl vs. kontrola	RG 5% NaCl vs. kontrola	RG 5% NaCl vs. 2% NaCl
celkový počet spotov/počet vyhodnocovaných	315/310	172	204	204
nadexpresia	63	92	63	60
podexpresia	247	80	141	144
nad 1 rád	38	46	31	43
pod 1 rád	116	44	56	46

nad 2 rády	7	3	5	1
pod 2 rády	2	3	3	3

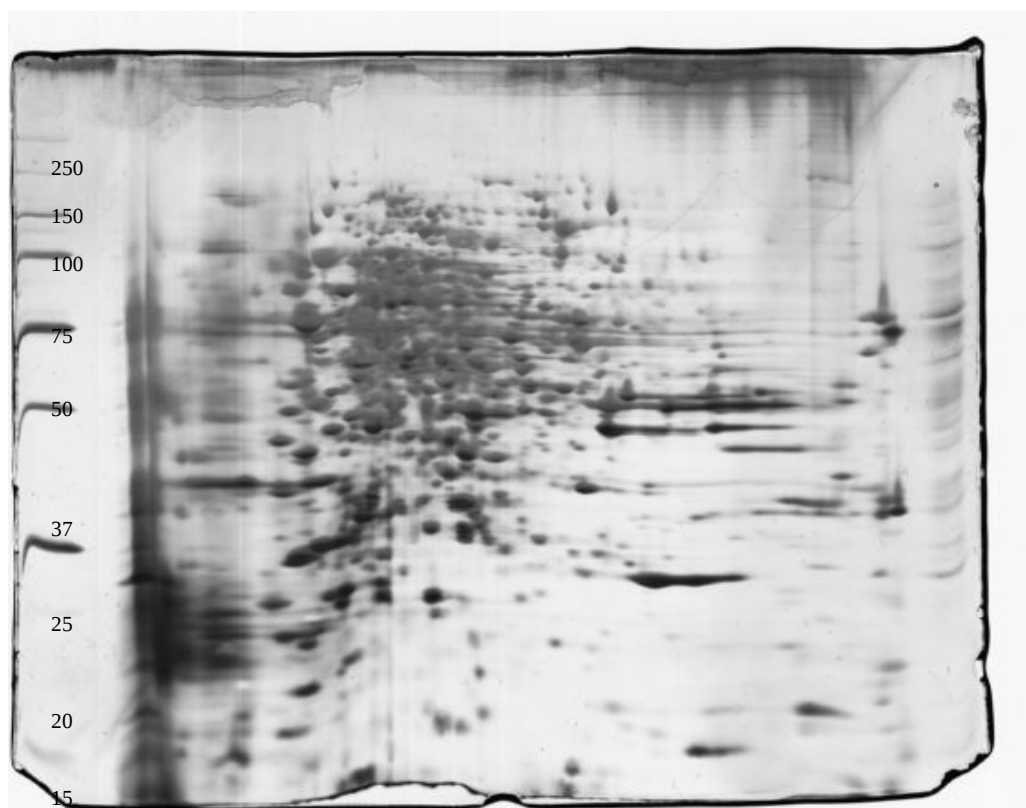
Boli zaznamenané jasné zmeny proteómu kvasinky *R. glutinis* zistené pomocou 2D elektroforézy a následnej MS analýzy. Najväčšie zmeny boli pozorované u oxidačných stresov (2mM H₂O₂), kde bolo podexprimovaných až 247 spotov z 310 vyhodnocovaných. 116 proteínov malo zníženú expresiu o jeden rád, 2 až o dva rády. Zvýšenú expresiu vykázalo 63 proteínov, z nich 38 bolo exprimovaných o 1 rád a 7 dokonca o 2 rády. Vcelku vyrovnaná stresová odozva (pomer nadexpresie a podexpresie proteínov) bola zaznamenaná u 2% NaCl – adaptácia kvasinky na tieto stresové podmienky mala pozitívny vplyv aj na produkciu karotenoidov (kap. 5.1.5.1), takže je možné, že sa bude týmto smerom uberať aj cielená priemyselná produkcia karotenoidov. Pri zvýšení koncentrácie soľného stresu (5% NaCl) došlo k podexpresii u ďalších 67 spotov bielkovín oproti 2% NaCl.

Došlo tiež k porovnaniu dvoch druhov soľného stresu navzájom (2% NaCl a 5% NaCl). Oproti 2% NaCl došlo u 5% NaCl k nadexpresii u 60 proteínov a podexprimovaných bolo až 144 proteínov. Z týchto výsledkov vyplýva, že kvasinka sa lepšie adaptuje jemnejšiemu vplyvu stresových faktorov. Ukážka kvantitatívneho vyhodnotenia proteínov z *R. glutinis* (porovnanie 2% NaCl vs. 5% NaCl) je v prílohe 4.

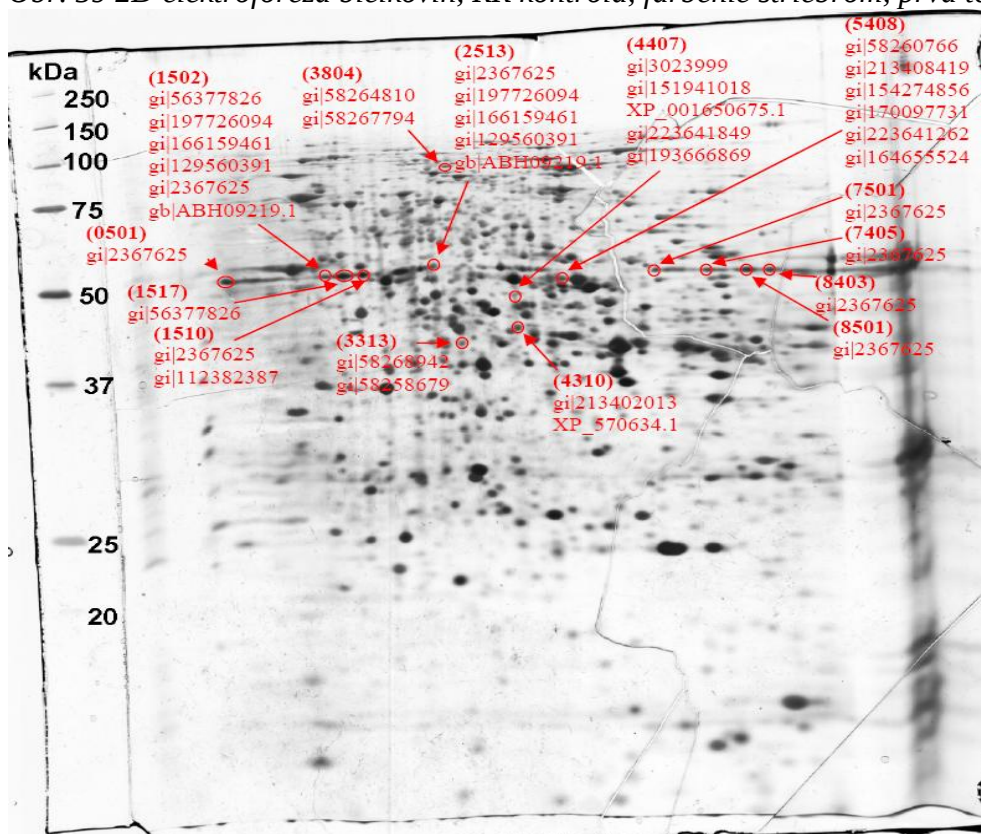
U oboch stresových faktorov je možné nájsť skupiny proteínov, ktoré vykazujú zmeny expresie podobného typu, pravdepodobne sa jedná o proteíny, ktoré boli združené v zónach proteínov na 1D géloch. Výraznejšie zmeny expresie vykazovali najmä enzýmy zahrnuté v primárnych metabolických dráhach kvasinky, ako je citrátový cyklus, glykolýza, proteosyntéza a stresová odozva.

5.1.4.2 *Rhodotorula rubra*

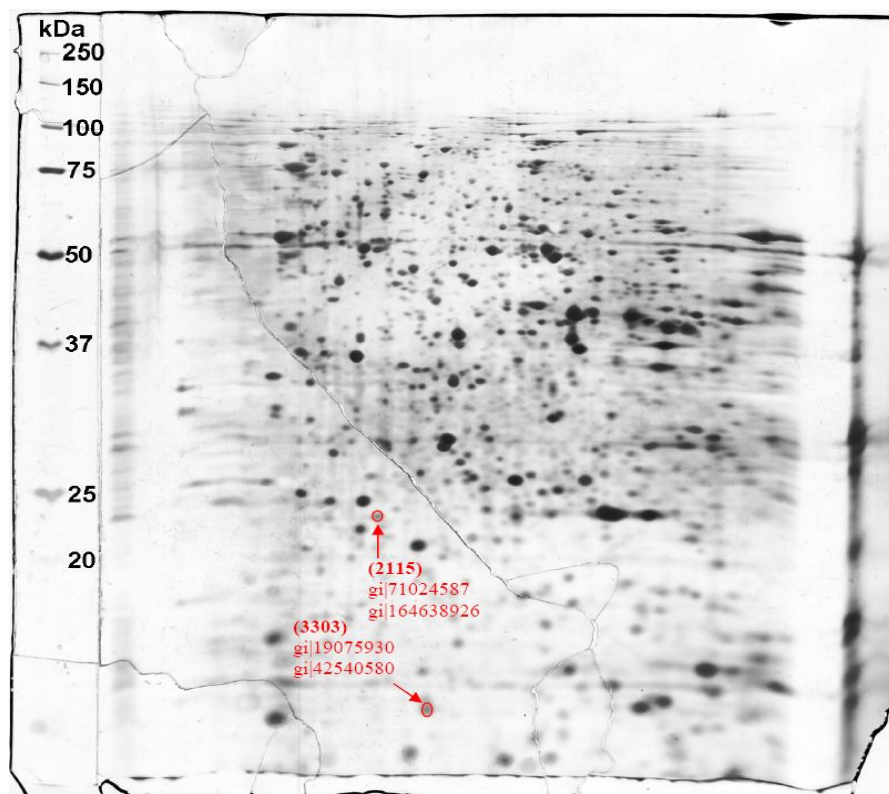
Ako druhý analyzovaný kmeň bola vybratá *Rhodotorula rubra*. Aj v tomto prípade sa jednalo najmä o zaznamenanie rozdielov v proteínových profiloch medzi kontrolnou vzorkou a proteínmi izolovanými z organizmov ovplyvnených oxidačným a osmotickým stresom (kap. 4.2.1.2). 2D elektroforéza (kap. 4.4.6) a MS analýzy (kap. 4.4.7) boli prevedené v spolupráci s Laboratóriom funkčnej genomy a proteomiky Prírodovedeckej fakulty MÚ. Keďže *R. rubra* vykázala zvýšenú odolnosť voči stresovým podmienkam, čo bude vidieť pri analýze karotenoidov v kap. 5.1.5.2, bude zaujímavé zistiť, aké zmeny nastali v proteomickom zložení tejto kvasinky.



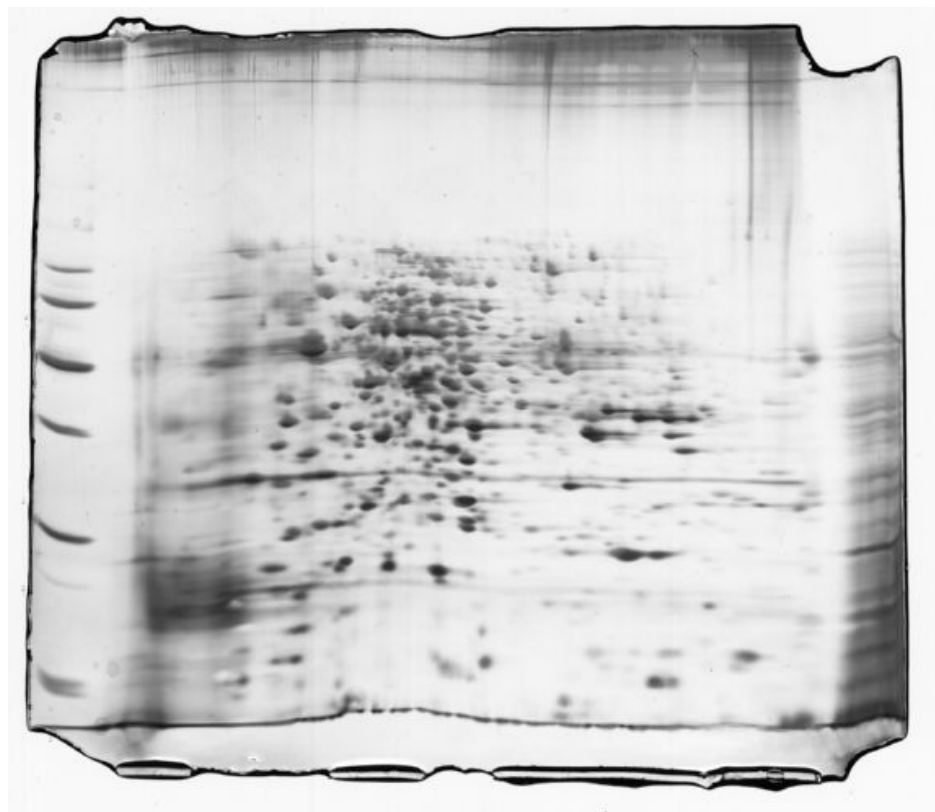
Obr. 59 2D elektroforéza bielkovín, RR kontrola, farbenie striebrom, prvá testovacia analýza



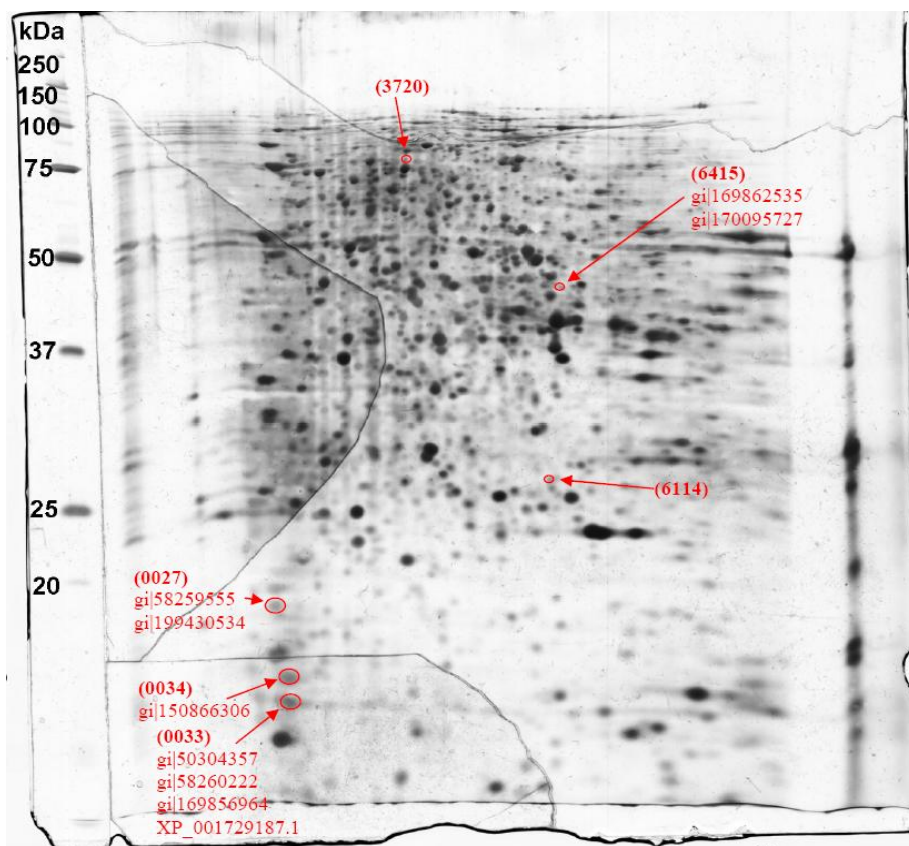
Obr. 60 2D elektroforéza bielkovín, RR kontrola, farbenie striebrom



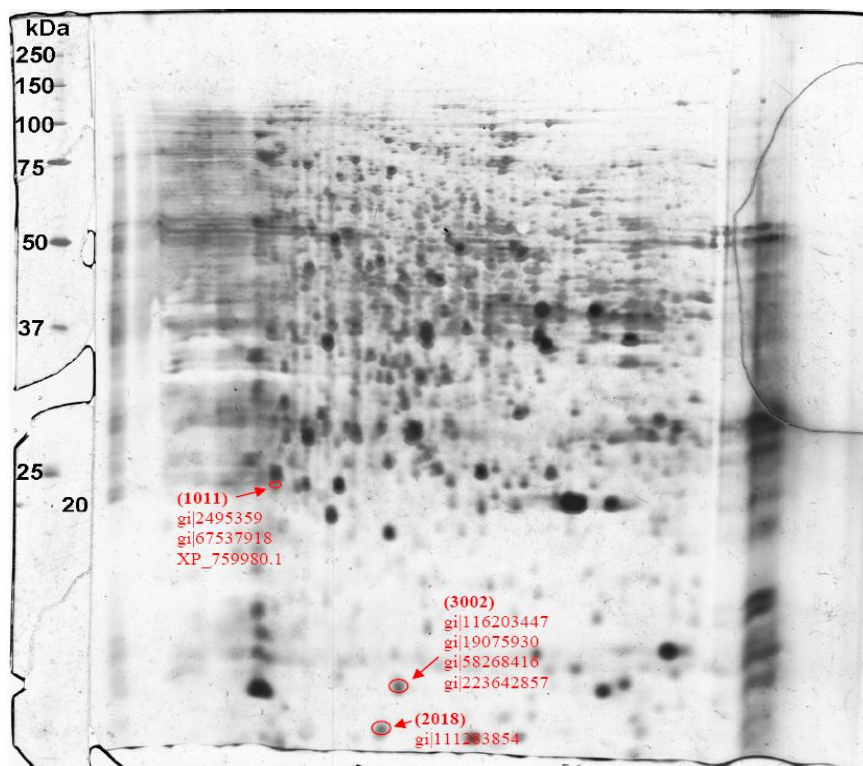
Obr. 61 2D elektroforéza bielkovín, RR 2mM H_2O_2 , farbenie striebrom



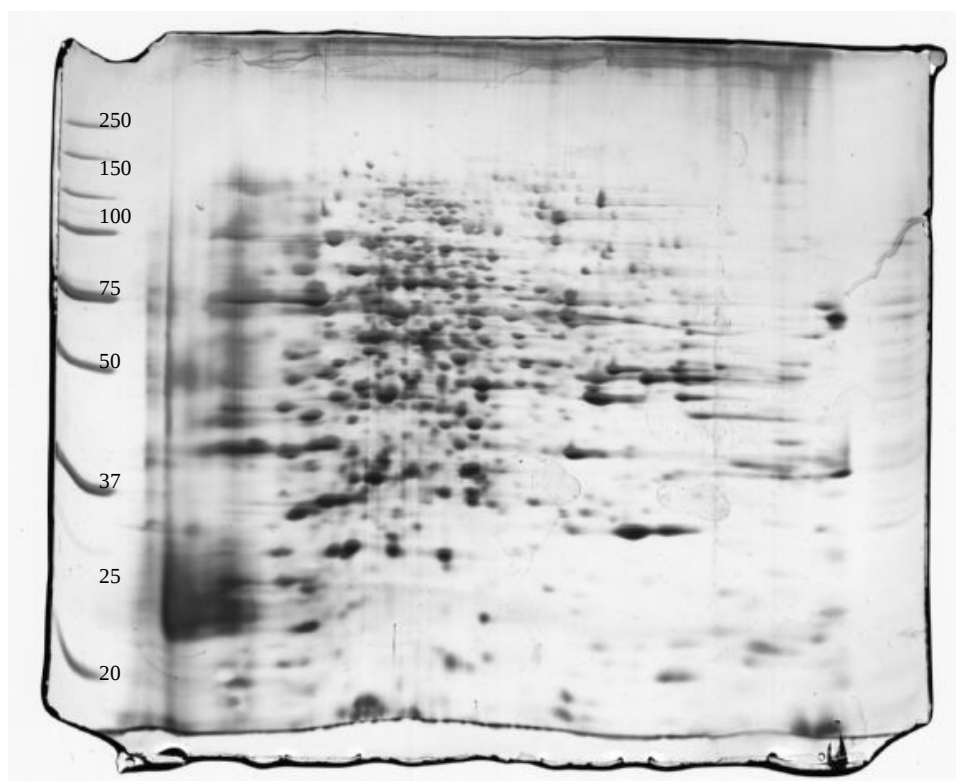
Obr. 62 2D elektroforéza bielkovín, RR 5mM H_2O_2 , farbenie striebrom



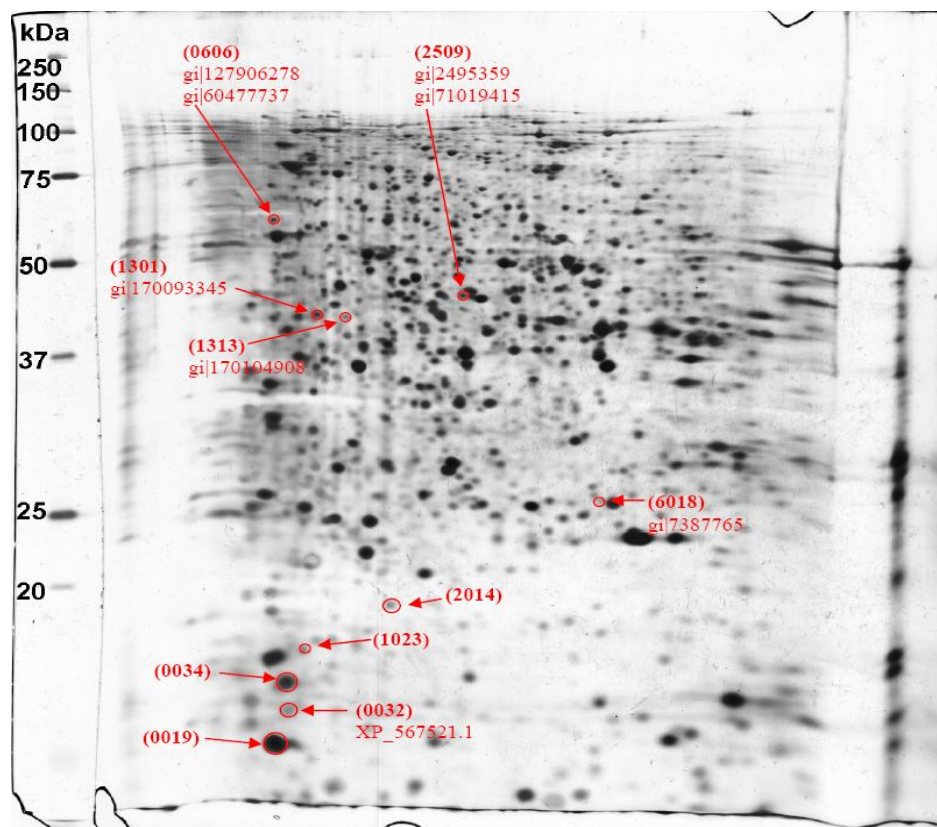
Obr. 63 2D elektroforéza bielkovín, RR 5mM H₂O₂, farbenie striebrom



Obr. 64 2D elektroforéza bielkovín, RR 2% NaCl, farbenie striebrom



Obr. 65 2D elektroforéza bielkovín, RR 5% NaCl, farbenie striebrom



Obr. 66 2D elektroforéza bielkovín, RR 5% NaCl, farbenie striebrom

Boli zaznamenané zmeny proteómu u kvasinky *R. rubra* (kontrolná vzorka vs. stresované bunky osmotickým a oxidačným stresom). Najväčšie zmeny boli pozorované u soľných stresov, kde pri 2% NaCl bolo podexprimovaných 89 spotov a u 5% NaCl 83 spotov proteínov. Nadexprimovaných bolo 45 spotov u 2% NaCl a 38 spotov u 5% NaCl. U oxidačných stresov bola zaznamenaná lepšia adaptačná schopnosť než u soľných stresov. Hoci bolo u oboch typov stresov viac podexprimovaných spotov (57 u 2mM H₂O₂, 65 u 5mM H₂O₂), počet nadexprimovaných bol na podobnej úrovni (33 u 2mM H₂O₂ a 45 u 5mM H₂O₂).

Tab. 39 Kvantitatívna analýza proteínov z kvasinky *Rhodotorula rubra*

	RR 2mM H ₂ O ₂ vs. kontrola	RR 5mM H ₂ O ₂ vs. kontrola	RR 2% 2% NaCl vs. kontrola	RR 5% 5% NaCl vs. kontrola	RR 5mM H ₂ O ₂ vs. 2mM H ₂ O ₂	RR 5% NaCl vs. 2% NaCl	RR 2% 2% NaCl vs. 2mM H ₂ O ₂	RR 5% 5% NaCl vs. 5mM H ₂ O ₂
celkový počet spotov, pomer kontrola vs. stres, alebo stres vs. stres	90/68	110/72	128/104	121/75	62/48	102/83	73/59	40/26
nadexpresia	33	45	45	38	23	46	30	13
podexpresia	57	65	89	83	40	71	29	13
nad 1 rád	20	23	32	26	11	31	8	5
pod 1 rád	20	20	46	36	18	32	13	11
nad 2 rády	1	0	0	0	0	4	0	0
pod 2 rády	0	2	1	2	0	2	0	0

V proteomickej analýze kvasinky *R. rubra* bolo detekovaných menej proteínov a zmeny v zložení proteómu nie sú tak viditeľné ako u *R. glutinis*. Pri náraste koncentrácie stresových faktorov dochádza aj k zmenám proteómu, obvykle v tom istom smere. U oboch kvasiniek bolo nájdených cca 5 skupín proteínov, ktoré vykazujú podobné zmeny počas vplyvu stresových faktorov. Najčastejšie sa jedná o proteíny skupiny HSP.

5.1.4.3 Identifikácia proteínov

Súčasťou proteomických experimentov bola aj snaha identifikovať u študovaných kvasiniek jednotlivé proteíny, u ktorých došlo vplyvom stresu k významnej zmene expresie a je možné očakávať, že budú majoritne zapojené v metabolických dráhach súvisiacich so stresovou odozvou. V rámci opakovaných experimentov, pri ktorých boli gély hodnotené triplicitne,

proteíny analyzované pomocou hmotnostnej spektrometrie a porovnané s dostupnými databázami, sa podarilo identifikovať približne 25% zo spotov, u ktorých došlo k významnej zmene expresie (najmenej 3x vyššia alebo nižšia intenzita spotu, Image analýza).

Proteíny boli analyzované výberom z 2D gélov na základe vyhodnotenia z Image analýzy (hodnotené boli spoty so zmenou intenzity ≥ 3 proti kontrole), ďalej bola prevedená in-gel digestia ((trypsin, 40°C, 2 hod, 45 min) a analýza vrátane identifikácie niektorou s nasledovných kombinácií: MALDI MS, MALDI MS/MS NCBI, MALDI MS/MS EST, LC-MS/MS NCBI a LC-MS/MS EST_others. Proteínové hity boli hľadané proti NCBI-Fungi a EST-Fungi databáze. Prednostne boli uvádzané hity z NCBI databázy, pokiaľ boli zhodné s hitmi z EST databázy. Pokiaľ bol názov proteínu v NCBI databáze príliš všeobecný (“hypothetical protein...” a podobne) a zhodné peptidy boli pozorované aj pri hľadaní proti EST databáze, je uvedený ekvivalent pozorovaný v EST databáze. V prípade potreby, pre zaistenie pravdepodobnej funkcie proteínového hitu, bol u pozorovaných peptidov prevedený blast search proti NCBI databáze. Prehľad identifikovaných proteínov podľa databáz a prehľad ďalších údajov týkajúcich sa detailov analýzy, je uvedený v nasledovných tabuľkách.

Tab. 40: Prehľad proteínov identifikovaných u kvasinky *Rhodotorula glutinis*

Spot #	názov proteínu/popis	organizmus	Prístup č.	Teor. pl	Teor. Mr (Da)	metóda identifikácie	Proteíny zodpovedajúce rovnakej sérii peptidov
3	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	<i>Paracoccus denitrificans</i>	gi 69935130	9,3	37784	LCMSMS	
17	hypothetical protein BT9727_3871	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar konkukian	gi 49478546	4,8	19047	LCMSMS	
23	N/R						
2404	ATP synthase beta subunit	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	gi 9909582	6,2	16110	LCMSMS	gi 9909824; gi 9909826; gi 27375551; gi 38639178
2404	ATP synthase beta chain	<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama	gi 169852676		57796		
3306	hypothetical protein Reut_C6180	<i>Ralstonia eutropha</i>	gi 72383998	9,8	21853	LCMSMS	
3306	hypothetical protein	<i>Yarrowia lipolytica</i>	gi 50554603	5,3	34585	LCMSMS	gi 58258349; gi 116507076; gi 134106229

3306	phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	gi 58258349		90454		
4003	COG0553: Superfamily II DNA/RNA helicases, SNF2 family	<i>Escherichia coli</i>	gi 75511717	5,0	109747	LCMSMS	
6223	tetratricopeptide repeat domain protein	<i>Microscilla marina</i>	gi 124008214	9,4	47157	LCMSMS	
6223	hypothetical protein DEHA0C18106g (Isocitrate dehydrogenase)	<i>Debaryomyces hansenii</i>	gi 50419779		40582		
6223	homoisocitrate dehydrogenase, mitochondrial precursor, putative	<i>Candida dubliniensis</i>	gi 223645080		90454		
6223	mitochondrial NAD-homo-isocitrate dehydrogenase LysB	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 170087014		38496		
6407	predicted protein	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 164651031	6,3	44001		
6407	isocitrate dehydrogenase	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	gi 58266956	6,9	39391	LCMSMS	gi 134110744;
6407	predicted protein	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 164637839	5,5	65563	LCMSMS	
6416	N/R						
6507	N/R						
6605	adenylosuccinate lyase	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	gb AAW44699.1		53613		
6607	N/R						

6804	mutant tryptophan synthase	<i>Neurospora crassa</i>	gi 4151285	8,8		LCMSMS	gi 4151289; gi 4151291; gi 4151295; gi 4151297; gi 4151299; gi 28800025; gi 46138457; gi 85110137; gi 116205607; gi 145608566
6804	bifunctional tryptophan synthase TRP1	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 170087106		76055		
6901	hypothetical protein CC1G_12439	<i>Coprinopsis cinerea</i>	gi 116502828	6,8	112959	LCMSMS	
6901	oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	gi 58262862				
6901	2-oxoglutarate dehydrogenase complex E1 component	<i>Laccaria bicolor</i>	XP_001876081.1		113161		
7201	hypothetical protein MGL_3020	<i>Malassezia globosa</i>	gi 164657816	6,3	26769	LCMSMS	
7201	hypothetical protein MGL_4227	<i>Malassezia globosa</i>	gi 164654992	4,9	33892	LCMSMS	
7201	Gene info 20S proteasome subunit	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	XP_569251.1		27067		
7404	N/R						
8213	N/R						
6	ADP-ribosylation factor Arf1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	gi 19112910	5,8	20606	LCMSMS	gi 61676647; gi 116501735; gi 164648543; gi 164658341
6	ARF small monomeric GTPase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	gi 58269752		20462		

		s var. <i>neoforman</i> s					
6	60s ribosomal protein I11	<i>Cryptococ</i> <i>cus</i> <i>neoforman</i> s var. <i>neoforman</i> s	gi 5826001 2		19651		
9	N/R						
102	tRNA intron endonuclease	<i>Nitrosopum</i> <i>ilus</i> <i>maritimus</i>	gi 1615279 58	8,9	23500	LCMSMS	
14 (XY)	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorul</i> <i>a</i> <i>mucilagino</i> <i>sa</i>	gb AAB69 702.1				
14 (XY)	elongation factor-1 alpha	<i>Rhodotorul</i> <i>a</i> <i>armeniaca</i>	dbj BAD74 126.1				
14 (XY)	ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor	<i>Cryptococ</i> <i>cus</i> <i>neoforman</i> s var. <i>neoforman</i> s	XP_571326. 1		57912		
14 (XY)	eukaryotic ADP/ATP carrier	<i>Cryptococ</i> <i>cus</i> <i>neoforman</i> s var. <i>grubii</i>	gb ABB728 49.1				
XY	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorul</i> <i>a</i> <i>mucilagino</i> <i>sa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	
XY	F0F1 ATP synthase subunit alpha	<i>Geobacter</i> <i>sulfurreduc</i> <i>ens PCA</i>	gi 3999522 2	5,7	54718	LCMSMS	
303	GTPase	<i>Cryptococ</i> <i>cus</i> <i>neoforman</i> s var. <i>neoforman</i> s	gi 5826177 2	4,8	26763	LCMSMS	
303	inorganic diphosphatase, putative	<i>Aspergillus</i> <i>clavatus</i>	gi 1217051 90	5,3	32498	LCMSMS	
303	GTP-binding protein RAB5	<i>Lentinula</i> <i>edodes</i>	gi 1513370 03				
303	hypothetical protein CC1G_03651	<i>Coprinopsis</i> <i>cinerea</i> <i>okayama</i>	XP_0018288 57.1		27296		

503	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	
503	hypothetical protein CC1G_03705	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>	gi 116510023	6,2	53618	LCMSMS	
503	hypothetical protein DDB_0191262	<i>Dictyostelium discoideum</i>	gi 66825125	6,0	44316	LCMSMS	gi 116497789; gi 164647374
503	6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 170097731				
503	6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Candida dubliniensis</i>	gi 223641262				
607	hypothetical protein DDB_0191262	<i>Dictyostelium discoideum</i>	gi 66825125	6,0	44316	LCMSMS	gi 116497789; gi 164647374
607	ATP synthase beta chain	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>	gi 116505814	5,6	57891	LCMSMS	
607	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	gi 66969461; gi 78100257; gi 111283854; gi 111283884
607	translation elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gb ABH09219.1				
607	ATP synthase beta chain	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>	gi 169852676		57796		
1105	YPT1-related protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	gi 5146	5,9	23145	LCMSMS	
1105	GTP-binding protein	<i>Laccaria bicolor</i>	XP_001881382.1		22815		
1107	60S ribosomal protein L10	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	gi 154302810	10,3	25356	LCMSMS	
1107	hypothetical protein NCU09442	<i>Neurospora crassa</i>	gi 85090806	5,0	19705	LCMSMS	
1107	ABC transporter related	<i>Thermotoga petrophila</i>	gi 148269838	5,2	30144	LCMSMS	

1201	hypothetical protein UM05139.1	<i>Ustilago maydis</i>	gi 71022111	10,2	28122	LCMSMS	
1901	N/R						
1911	heat shock protein 90	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	gi 623613	4,9	80725	LCMSMS	gi 19115277
1911	cyt P-450-9-deoxo-FK506 hydroxylase e	<i>Streptomyces</i> sp.	gi 1522693	4,9	42278	LCMSMS	gi 7481902; gi 9280399
1911	heat-shock protein 90	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	gb AAN76525.1				
2802	hypothetical protein CC1G_03927	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>	gi 116505360	4,9	79755	LCMSMS	gi 164646718
2802	heat-shock protein 90	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>	gb AAN76524.1				
2804	Cell Division Cycle related family member	<i>Caenorhabditis elegans</i>	gi 17531535	5,2	89729		
2804	hypothetical protein CC1G_09879	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>	gi 116507744	4,9	89678	LCMSMS	gi 164650218
2804	heat shock protein of HSP70 family	<i>Pichia stipitis</i>	gi 126274105	5,1	77730	LCMSMS	
2804	hypothetical protein AN1047.2	<i>Aspergillus nidulans</i>	gi 67517731	5,1	81096	LCMSMS	gi 70995752; gi 83773051; gi 115491823; gi 116507894; gi 119495435; gi 121701465; gi 145240001; gi 164647445
2804	Di- and tricarboxylate transporter	<i>Lactobacillus gasseri</i>	gi 116629170	9,5	52400	LCMSMS	
2804	hypothetical protein MGL_0198 (ATPases)	<i>Malassezia globosa</i>	XP_001732423.1		85649		

3105	Chain 1, Refined Structures Of Two Insertion(Slash)deletion Mutants Probe Function Of The Maltodextrin Binding Protein	<i>Escherichia coli</i>	gi 809263	5,1	39897	LCMSMS	
3106	bla regulator protein blaR1	<i>Staphylococcus aureus</i>	gi 32470367	9,6	68950	LCMSMS	
3110	subunit of the signal recognition particle	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	gi 159476318	8,5	74845	LCMSMS	
3110	uracil phosphoribosyltransferase 1	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	XP_570874.1		25456		
3207	N/R						
3901	ubiquitin-activating enzyme E1 1	<i>Neurospora crassa</i>	gi 85078281	5,0	115288	LCMSMS	gi 46136347; gi 116196604; gi 39951533; gi 111062605
3901	hypothetical protein Swol_0169	<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i>	gi 114565738	5,1	68897	LCMSMS	
3901	ubiquitin activating enzyme	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	XP_566574.1		112491		
6104	N/R						
7802	hypothetical protein CC1G_10805	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i>	gi 116504019	6,0	82419	LCMSMS	
7802	hypothetical protein CC1G_00401	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i>	gi 116501987	6,2	84548	LCMSMS	gi 164651222
7802	predicted protein	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 164648650	6,2	84677	LCMSMS	
7802	aconitase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	XP_570245.1		85833		

		s var. neoforman s					
7802	5- methyltetrahydr opteroyltriglutam ate- homocysteine S- methyltransferas e	Cryptococ cus neoforman s var. neoforman s	XP_567704. 1		85231		
7903	translation elongation factor	Candida norvegica	gi 4717681 2	5,3	21953		
7903	Chain 1, Refined Structures Of Two Insertion(Slash)d eletion Mutants Probe Function Of The Maltodextrin Binding Protein	Escherichia coli	gi 809263	5,1	39897	LCMSMS	gi 2623823; gi 2654021; gi 3983122; gi 4930066; gi 13787059
7903	Elongation factor 2 (EF-2), also encoded by EFT1	Saccharo myces cerevisiae	gi 6320593	5,9	93230	LCMSMS	gi 55670150
7903	hypothetical protein CNBD0200	Cryptococ cus neoforman s var. neoforman	gi 1341102 86	6,0	92562	LCMSMS	
7903	translation elongation factor	Candida norvegica	gi 4717681 2	5,3	21953	LCMSMS	
7903	hypothetical protein An02g05700	Aspergillus niger	gi 1452325 25	6,5	93589	LCMSMS	
7903	hypothetical protein GSPATT00038104 001	Parameciu m tetraurelia	gi 1455021 60	4,9	114275	LCMSMS	
7903	eukaryotic translation elongation factor 2	Postia placenta	gb EED796 33.1				
7905	Elongation factor 2 (EF-2)	Candida albicans	gi 3023682	6,1	93295		
7905	hypothetical protein CC1G_00516	Coprinopsis cinerea okayama	gi 1165094 02	6,2	93645	LCMSMS	
7905	hypothetical protein (similar to	Coprinopsis cinerea	XP_0018293 37.1				

	elongation factor 2)	<i>okayama</i>					
9201	AER184Wp	<i>Ashbya gossypii</i>	gi 45190787	9,9	33128	LCMSMS	
9201	hypothetical protein UM05662.1	<i>Ustilago maydis</i>	gi 71023152	9,2	31895	LCMSMS	
9201	ATP:ADP antiporter	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	XP_568302.1		33666		
9201	elongation factor 1-alpha	<i>Lyophyllum favrei</i>	gb ABR12247.1				
9201	voltage-dependent ion-selective channel	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	gi 58265296		30506		
9201	likely cytosolic ribosomal protein S2	<i>Candida albicans</i>	gi 68475083		26742		
9201	hypothetical protein UM05139.1 (30S ribosomal protein S5P)	<i>Ustilago maydis</i>	gi 71022111		28009		

Tab. 41: Prehľad proteínov identifikovaných u kvasinky *Rhodotorula rubra*

Spot #	názov proteínu/popis	organizmus	Prístup č.	Teor. pl	Teor. Mr (Da)	metóda identifikácie	Proteíny zodpovedajúce rovnakej sérii peptidov
0501	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	
1502	elongation factor-1 alpha	<i>Rhodotorula marina</i>	gi 56377826	6,7	25136	LCMSMS	gi 56377830; gi 56377834
1502	translation elongation factor 1-alpha	<i>Uromyces sommerfeltii</i>	gi 197726094				
1502	translation elongation factor 1-alpha	<i>Armillaria ectypa</i>	gi 166159461				
1502	elongation factor 1 alpha	<i>Microbotryum violaceum</i>	gi 129560391				

1502	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625				
1502	translation elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gb ABH09219.1				
1510	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	
1510	translation elongation factor 1-alpha	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	gi 112382387				
1517	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	
2513	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	
2513	translation elongation factor 1-alpha	<i>Uromyces sommerfeltii</i>	gi 197726094				
2513	translation elongation factor 1-alpha	<i>Armillaria ectypa</i>	gi 166159461				
2513	elongation factor 1 alpha	<i>Microbotryum violaceum</i>	gi 129560391				
2513	translation elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gb ABH09219.1				
3313	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	gi 58268942		36160		
3313	methionine adenosyltransferase	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	gi 58258672		43063		
3804	cytoplasm protein	<i>Cryptococcus neoformans</i>	gi 58264810	5,8	83286	LCMSMS	

3804	5-oxoprolinase	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	gi 58267794		81964		
4310	homoisocitrate dehydrogenase	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	gi 213402013				
4310	isocitrate dehydrogenase	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	XP_570634.1		39284		
4407	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	<i>Aspergillus niger</i>	gi 3023999	8,5	55525	LCMSMS	gi 15027826; gi 15027827; gi 67525083; gi 83766186; gi 119177488; gi 145233997
4407	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 151941018				
4407	nadp-specific isocitrate dehydrogenase	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001650675.1		45707		
4407	isocitrate dehydrogenase [nadp]	<i>Candida dubliniensis</i>	gi 223641849				
4407	similar to isocitrate dehydrogenase	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	gi 193666869		46292		
5408	phosphogluconate dehydrogenase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	gi 58260766	6,0	53693	LCMSMS	
5408	6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	gi 213408419				
5408	hypothetical protein HCAG_05884	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	gi 154274856		55601		
5408	6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 170097731		53227		

5408	6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Candida dubliniensis</i>	gi 223641262				
5408	hypothetical protein MGL_3885	<i>Malassezia globosa</i>	gi 164655524		53747		
7405	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	
7501	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	
8501	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	
8403	protein synthesis elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 2367625	8,5	43821	LCMSMS	
2115	hypothetical protein UM06376.1	<i>Ustilago maydis</i>	gi 7102458Z	5,5	21404	LCMSMS	
2115	GTP-binding protein sar1	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 164638926	5,7	21392	LCMSMS	
3303	thioredoxin peroxidase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	gi 19075930	5,4	21178	LCMSMS	
3303	thioredoxin peroxidase	<i>Taiwanofungus camphoratus</i>	gi 42540580				
0027	D-hydroxyacid dehydrogenase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	gi 58259555	6,4	38566	LCMSMS	
0027	DEHA2C04312p (similar to Saccharomyces cerevisiae pseudouridine synthases)	<i>Debaryomyces hansenii</i>	gi 199430534				
0033	unnamed protein product (Ribosomal protein L14)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	gi 5030435Z		14880		
0033	ribosomal protein	<i>Cryptococcus neoformans</i>	gi 58260222		15301		

		<i>s var. neoforman s</i>					
0033	40S ribosomal protein S14	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>	gi 169856964		15870		
0033	hypothetical protein MGL_3654 (Ribosomal protein S9/S16)	<i>Malassezia globosa</i>	XP_001729187.1		16262		
0034	G-protein beta subunit	<i>Pichia stipitis</i> CBS	gi 150866306	6,6	48694	LCMSMS	
3720	N/R						
6114	N/R						
6415	hypothetical protein (NAD dependent epimerase/dehydratase family)	<i>Coprinopsis cinerea okayama</i>	gi 169862535		42244		
6415	predicted protein (NAD dependent epimerase/dehydratase family)	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 170095727		39611		
1011	Heat shock protein HSS1	<i>Puccinia graminis</i>	gi 2495359	5,1	70538	LCMSMS	
1011	HS70_TRIRU Heat shock 70 kDa protein	<i>Aspergillus nidulans</i>	gi 67537918	5,0	69874	LCMSMS	
1011	GTP-binding protein	<i>Ustilago maydis</i>	XP_759980.1		22801		
2018	translation elongation factor 1-alpha	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	gi 111283854				
3002	ubiquitin-conjugating enzyme E2	<i>Chaetomium globosum</i>	gi 116203447	5,9	16416		
3002	thioredoxin peroxidase Tpx1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	gi 19075930	5,4	21178	LCMSMS	
3002	ubiquitin-conjugating enzyme	<i>Cryptococcus neoformans</i>	gi 58268416				
3002	peroxiredoxin, putative; thioredoxin peroxidase,	<i>Candida dubliniensis</i>	gi 223642857				

	putative						
0019	N/R						
0032	ribosomal protein	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	XP_567521.1		15301		
0034	N/R						
1023	N/R						
1301	protein arginine N-methyltransferase	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 170093345		38610		
1313	argininosuccinate synthase	<i>Laccaria bicolor</i>	gi 170104908		46053		
0606	beta-tubulin	<i>Mesenchytraeus solifugus</i>	gi 127906278	5,5	39873		
0606	beta tubulin 3	<i>Trametes versicolor</i>	gi 60477737	5,8	43090	LCMSMS	
2014	N/R						
2509	Heat shock protein HSS1	<i>Puccinia graminis</i>	gi 2495359	5,1	70538	LCMSMS	
2509	hypothetical protein UM03791.1 (similar to heat shock protein 70 family)	<i>Ustilago maydis</i>	gi 71019415		70202		
3411	heat shock protein	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	gi 58258689		66996		
6018	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	gi 7387765				

Identifikované proteíny sú lokalizované vo všetkých častiach bunky. Z hlavných proteínov cytoplazmy boli opakovane identifikované napr. 6-P-glukonátdehydrogenáza (gil223641262), anorganická difosfatáza (gil121705190), ubiquitinín-aktivujúci enzým (gil85078281), tryptofán-syntháza (gil170087106), glyceraldehyd-3-P-dehydrogenáza (gil58268942), peroxiredoxín (gil223642857) a niektoré HSP proteíny (HSP90, HSP70). Z jadrových proteínov boli často identifikované DNA/RNA helikázy.

Mitochondriálne proteíny zahŕňajú najmä často sa opakujúcu beta podjednotku ATP syntázy (gil9909582, il169852676...), homoizocitrát-dehydrogenázu (gil223645080), 2-oxoglutarát-dehydrogenázu (gil58262862), transportný systém ATP-ADP (gblABB72849.1), akonitázu (XP 570245.1) a NADP dependentnú izocitrát-dehydrogenázu (gil151941018). V endoplazmatickom retikule sa vyskytujú mnohopočetne identifikované elongačné faktory - translačný elongačný faktor (gil47176812), elongačný faktor -alfa, elongačný faktor 2 a ribozomálny proteín 60S (gil58260012).

Všeobecne je možné zhrnúť, že v oboch analyzovaných kmeňoch rodu *Rhodotorula* boli pozorované niektoré podobné zmeny expresie vyvolanej stresom, či už išlo o zmeny proteínov zapojených v proteosyntéze (napr. elongačné faktory, ribozomálne proteíny), v primárnom metabolizme (napr. ICDH, ATP-syntáza, ATP-ADP mitochondriálny transportný systém) i v samotnej stresovej odozve (napr. HSP70, HSP90; ubiquitín-aktivačný enzým, thioredoxín peroxidáza a ďalšie). Zvýšená expresia bola pozorovaná u niektorých metabolických enzýmov hlavných dráh primárneho metabolizmu: enzýmy Krebsovho cyklu (ICDH, akonitáza, 2-oxoglutarát-dehydrogenáza); beta-oxidácia mastných kyselín (dehydrogenáza hydroxy-kyselín), metabolizmu aminokyselín i faktorov zapojených v proteosyntéze. Nadexprimované boli tiež samotné stresové proteíny (HSP70, HSP 90; HSS1, thioredoxín-peroxidáza) a proteíny zapojené v regulácii obratu proteínov (ubiquitín-aktivujúci enzým). Naopak významne znížená expresia bola zaznamenaná u enzýmov glykolýzy (glyceraldehyd-3P-dehydrogenáza), syntézy mastných kyselín (dehydratáza MK) a tiež u niektorých stresových a regulačných proteínov (napr. beta-podjednotka G-proteínu a niektoré HSP).

Niektoré z identifikovaných proteínov budú v ďalších naväzujúcich prácach študované podrobnejšie na molekulovej úrovni.

5.1.5 Analýza antioxidačných látok v kvasinkových mikroorganizmoch

Karotenogénne kvasinkové kmene majú veľký potenciál v prípadnom priemyselnom využití v oblasti mikrobiálnej nadprodukcie vybraných metabolitov, v tomto prípade karotenoidov. Najvyššie zastúpenie má v bunkách analyzovaných kmeňov β -karotén. Vhodnými úpravami kultivačných podmienok (napr. aplikáciou exogénnych stresových faktorov) dochádza k nárastu biomasy a aj k zvýšenej syntéze karotenoidov. Analýzy boli prevedené na kvasinkách rodov *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* a *Cystofilobasidium*. Kultivačné podmienky pre kvasinky rastúce za štandardných podmienok sú popísané v kap. 4.2.1.1, podmienky rastu pre kvasinky kultivované za stresových podmienok sú uvedené v kap. 4.2.1.2. Izolácia karotenoidov bola prevedená viacstupňovou extrakciou organickými rozpúšťadlami (kap. 4.5.1). Následne boli karotenoidy analyzované pomocou HPLC so spektrofotometrickou detekciou (kap. 4.5.5). Kvantifikácia bola prevedená pomocou kalibračných kriviek externých štandardov. Identifikácia jednotlivých pigmentov bola verifikovaná pomocou on-line LC-MS [115].

Tab. 42 Kalibračné krivky pre metabolity izolované z karotenogénnych kvasiniek [119]

metabolit	regresná krivka
β -karotén	$A[\text{mV.s}] = 14,237 \times C_{\beta\text{-karotén}} [\mu\text{g/ml}]$
lykopén	$A[\text{mV.s}] = 25,25 \times C_{\text{lykopén}} [\mu\text{g/ml}]$

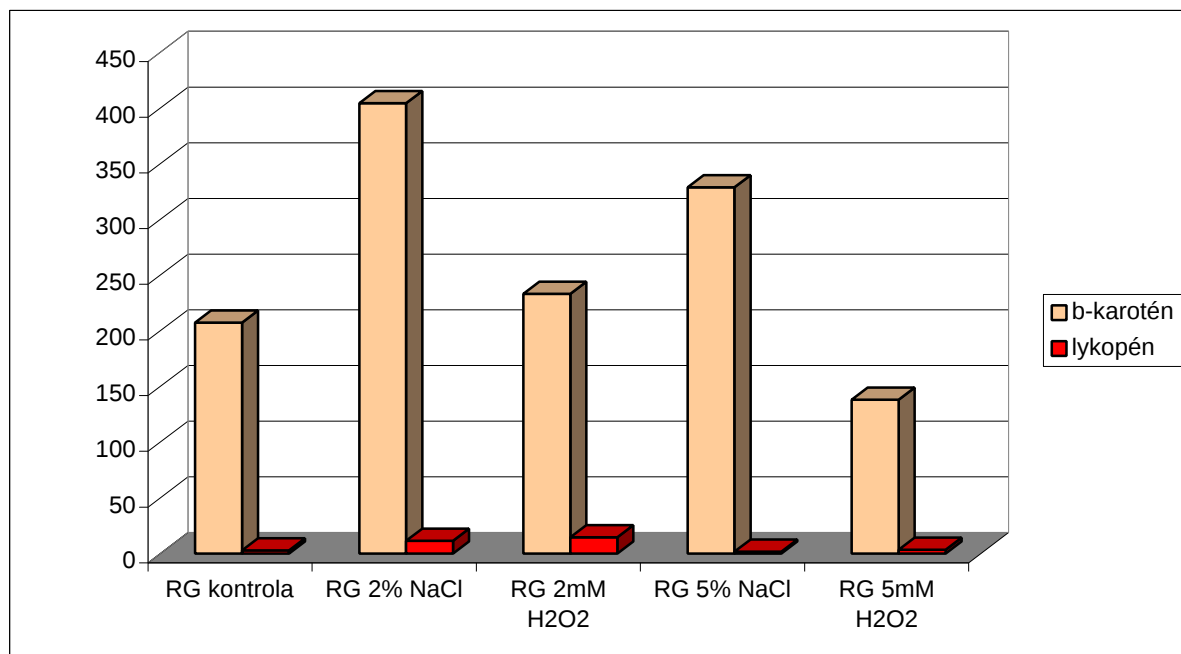
5.1.5.1 *Rhodotorula glutinis*

Keďže *Rhodotorula glutinis* je hlavný modelový organizmus celej práce, boli preto analýzy antioxidačných metabolitov izolované a analyzované najprv z tohto kmeňa. Súhrn nameraných dát je možné vidieť v Tab. 43, prehľadne sú dáta spracované v grafe 8.

Tab. 43 Súhrn analyzovaných metabolitov analyzovaných u kvasinky *R. glutinis* vrátane množstva biomasy

stresový faktor	β-karotén	lykopén	biomasa
	μg /g sušiny	μg /g sušiny	g/l
kontrola	207,52	2,92	10,09
2% NaCl	404,55	11,57	9,23
2 mM H ₂ O ₂	233,40	14,54	8,41
5% NaCl	329,02	1,79	10,30
5 mM H ₂ O ₂	138,24	3,55	7,21

Obsah biomasy u stresovaných buniek bol oproti kontrolnej vzorke okrem jedného prípadu (2mM H₂O₂) nižší, avšak pokles nebol vo väčšine prípadov výrazný. Z tohto vyplýva, že aplikácia stresových faktorov nevplýva až tak na rast buniek, ako skôr na deje, ktoré prebiehajú v bunke. Najmenšia biomasa bola zistená u vzorky s prídavkom 5% NaCl.



Graf 8 Produkcia β-karoténu a lykopénu kvasinkou *R. glutinis*

Čo sa týka obsahu karotenoidov, tak prídavkom stresových faktorov do živného média došlo k zvýšenej produkcii všetkých sledovaných metabolitov. Zreteľné je to najmä u β-karoténu, kde u

2% NaCl vzrástol podiel takmer dvojnásobne oproti kontrole. Zaujímavý nárast bol tiež pozorovaný u 5% NaCl. Z týchto zistení vyplýva, že táto forma stresu sa dá využiť na cielenú priemyselnú produkciu β -karoténu. U lykopénu bol najvyšší obsah zistený pri 2mM H_2O_2 strese (takmer 5-násobne). V tomto prípade nedošlo k úplnej konverzii lykopénu na β -karotén.

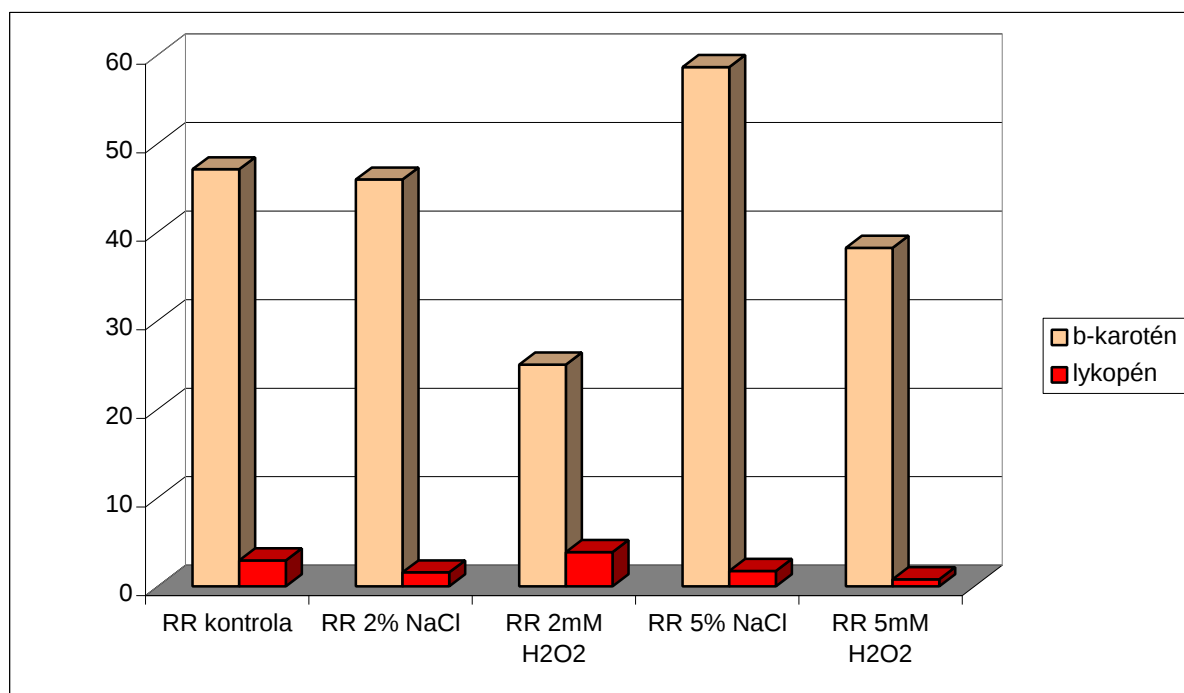
5.1.5.2 *Rhodotorula rubra*

Ako druhý bol analyzovaný kmeň *Rhodotorula rubra*. Súhrn nameraných dát je možné vidieť v Tab. 44, graficky sú dáta spracované v grafe pod tabuľkou.

Tab. 44 Súhrn analyzovaných metabolitov analyzovaných u kvasinky *R. rubra* vrátane množstva biomasy

stresový faktor	β -karotén	lykopén	biomasa
	$\mu g / g$ sušiny	$\mu g / g$ sušiny	g/l
kontrola	47,11	2,93	9,53
2% NaCl	45,95	1,58	8,09
2 mM H_2O_2	25,05	3,89	6,76
5% NaCl	58,64	1,74	6,09
5 mM H_2O_2	38,24	0,81	7,94

Nárast biomasy bol v tomto prípade u všetkých stresovaných buniek nižší než v kontrolnej vzorke. Najmenšia biomasa bola zistená u vzorky s prídavkom 2 mM H_2O_2 .



Graf 9 Produkcia β -karoténu a lykopénu kvasinkou *R. rubra*

Obsah karotenoidov po aplikácii stresových faktorov nevzrástol tak signifikantne ako u kmeňa *R. glutinis*. Dokonca sa dá povedať, že vyššia produkcia sledovaných metabolitov bola len u kmeňa stresovaného prídavkom 5% NaCl, kde došlo k nadprodukcii β -karoténu. U všetkých ostatných vzoriek nepresiahli obsahy metabolitov kontrolnú vzorku, s výnimkou lykopénu u 2 mM H_2O_2 .

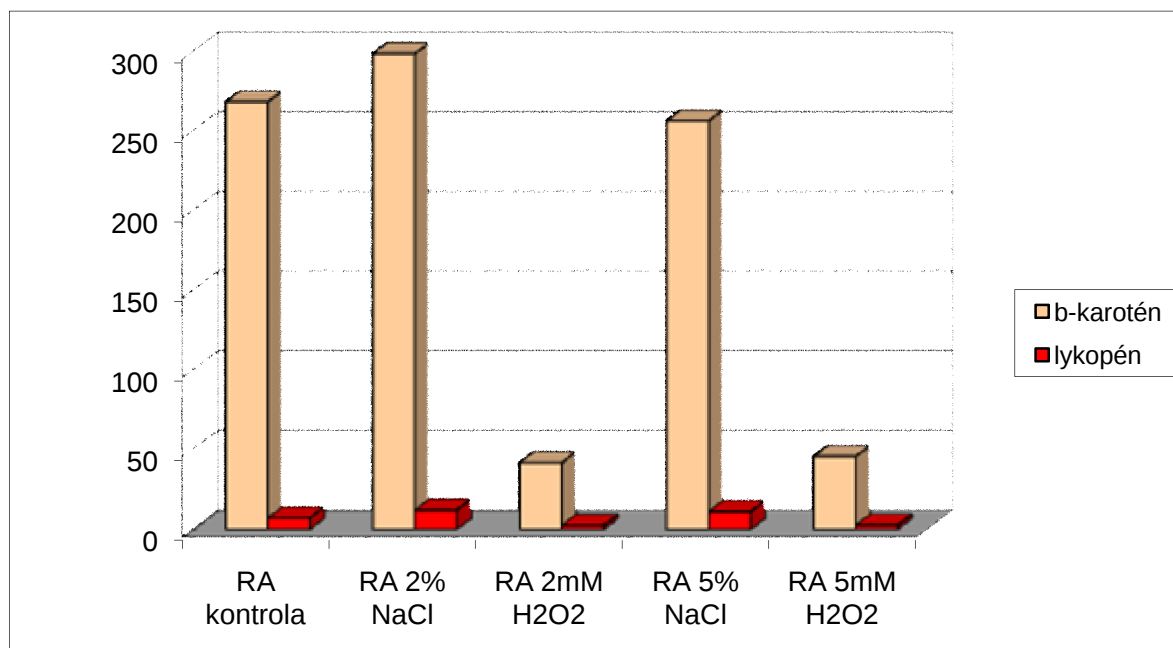
5.1.5.3 *Rhodotorula aurantiaca*

Súhrn nameraných dát pre kvasinku *Rhodotorula aurantiaca* je možné vidieť v Tab. 45.

Tab. 45 Súhrn analyzovaných metabolitov analyzovaných u kvasinky *R. aurantiaca* vrátane množstva biomasy

stresový faktor	β -karotén	lykopén	biomasa
	$\mu g / g$ sušiny	$\mu g / g$ sušiny	g/l
kontrola	268,57	7,33	4,69
2% NaCl	298,87	12,21	6,11
2 mM H_2O_2	41,91	2,63	4,63
5% NaCl	256,61	11,31	7,02
5 mM H_2O_2	45,82	2,76	6,77

U tejto kvasinky bolo množstvo nakultivovanej biomasy zreteľne nižšie ako u predchádzajúcich dvoch kmeňov rodu *Rhodotorula* - *R. glutinis* a *R. rubra*. Rozdiel je v produkcii pri peroxidovom strese, kde je množstvo biomasy vyššie než u kontrolnej vzorky, čo u predchádzajúcich kmeňov nebolo.



Obsah karotenoidov izolovaných z kmeňa *R. aurantiaca* je menší než u *R. glutinis*, ale zasa väčší než u *R. rubra*. Oproti kontrolnej vzorke bolo viac β -karoténu len v 2% NaCl, prekvapivo nízke hodnoty boli zistené u oxidačných stresov. Hodnoty lykopénu sú na podobnej úrovni ako u *R. glutinis*, aj v tomto prípade boli najvyššie hodnoty u soľných stresov a najnižšie u oxidačných stresov. Z výsledkov jasne vyplýva, že na cielené ovplyvnenie produkcie vybraných metabolitov sú u tejto kvasinky vhodnejšie soľné stresy zastúpené 2% NaCl a 5% NaCl.

Z uvedených výsledkov pre všetky tri kmene rodu *Rhodotorula* vyplýva, že na priemyselnú produkciu metabolitov je najvhodnejší kmeň *R. glutinis*. Naopak ako nevýhodné sa ukázalo využitie kmeňa *R. rubra*, pretože v tomto prípade kmeň prejavil veľkú odolnosť voči aplikovaným stresovým faktorom a produkcia metabolitov nebola uspokojivá. Celkovo z výsledkov vyplýva, že vhodným použitím najmä nižších koncentrácií stresových faktorov je možné dosiahnuť významné ovplyvnenie produkcie karotenoidov, a to za ekonomicky priaznivých podmienok.

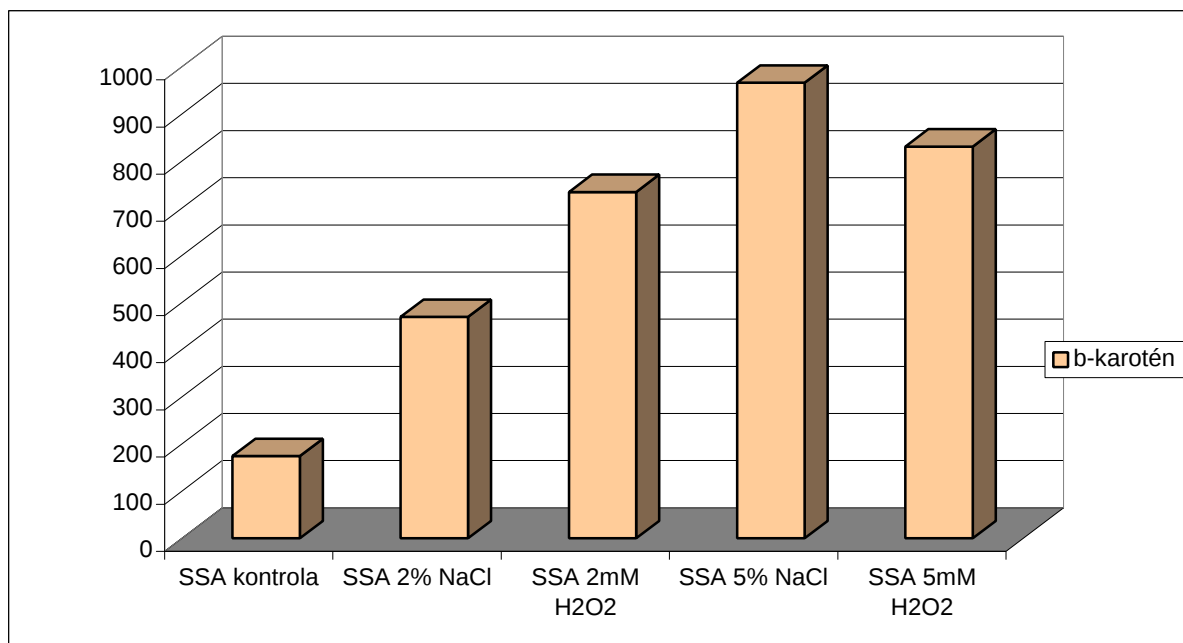
5.1.5.4 *Sporobolomyces salmonicolor*

Analýza karotenoidov prebehla aj u kmeňov rodu *Sporobolomyces*. Súhrn nameraných dát pre kvasinku *Sporobolomyces salmonicolor* je možné vidieť v Tab. 46. V tomto prípade bol analyzovaný len obsah β -karoténu a bola nameraná biomasa.

Tab. 46 Súhrn analyzovaných metabolitov analyzovaných u kvasinky *S. salmonicolor* vrátane množstva biomasy

stresový faktor	β -karotén	biomasa
	$\mu\text{g/g}$ sušiny	g/l
kontrola	174,33	5,83
2% NaCl	469,61	4,14
2 mM H_2O_2	734,61	3,13
5% NaCl	966,16	5,08
5 mM H_2O_2	830,81	1,95

Zistené množstvo biomasy u stresovaných foriem kvasinky *S. salmonicolor* je nižšie než v kontrolnej vzorke. V prípade 5 mM H_2O_2 je to dokonca minimálne množstvo.



Graf 11 Produkcia β-karoténu kvasinkou *S. salmonicolor*

Čo sa týka obsahu β-karoténu, tak u všetkých stresovaných foriem bol zistený vyšší obsah než v kontrolnej vzorke. Najvyšší obsah bol nameraný u 5% NaCl, kde bol podiel β-karoténu až 5-násobne vyšší než u kontroly. Produkcia biomasy však bola natoľko nízka, že tento kmeň nie je možné doporučiť ako potenciálneho producenta pre biotechnologické aplikácie.

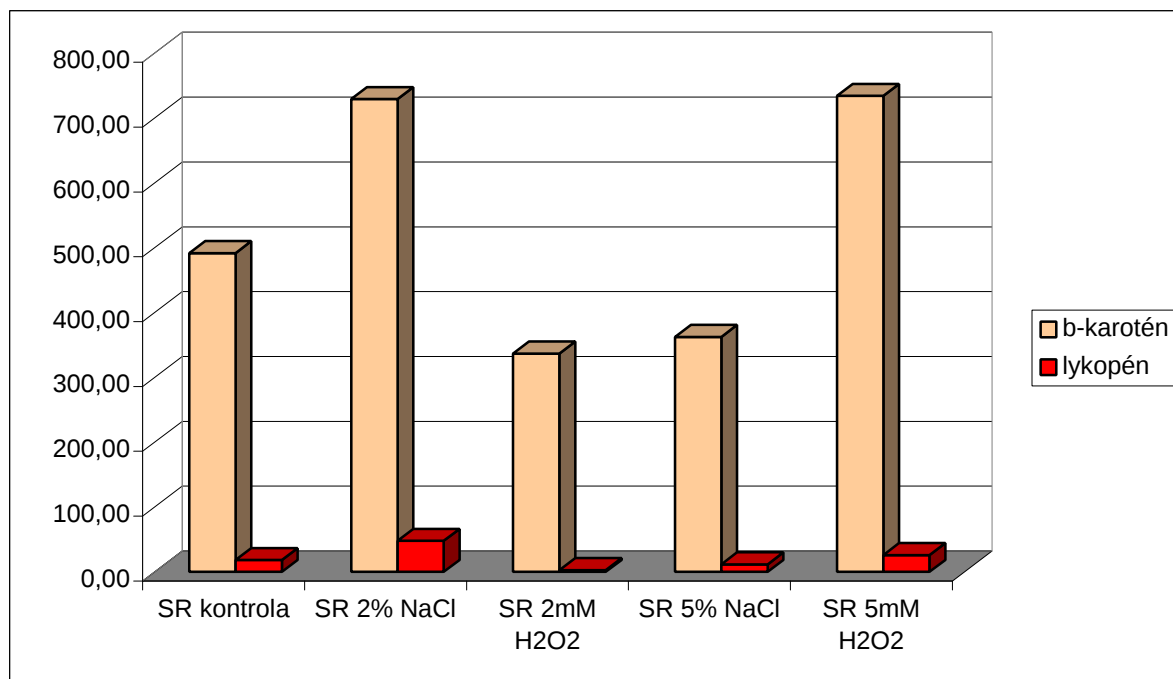
5.1.5.5 *Sporobolomyces roseus*

Súhrn nameraných dát pre kvasinku *Sporobolomyces roseus* je možné vidieť v Tab. 47.

Tab. 47 Súhrn analyzovaných metabolitov analyzovaných u kvasinky *S. roseus* vrátane množstva biomasy

stresový faktor	β-karotén µg /g sušiny	lykopen µg /g sušiny	biomasa g/l
kontrola	491,80	18,42	9,04
2% NaCl	729,34	47,87	3,30
2 mM H ₂ O ₂	336,93	2,90	3,32
5% NaCl	362,50	11,63	3,68
5 mM H ₂ O ₂	734,23	25,93	3,89

V prípade kvasinky *S. roseus* bol nárast biomasy v kontrolnej vzorke porovnateľný s kmeňmi rodu *Rhodotorula*. Prekvapujúci je však malý obsah biomasy u všetkých stresovaných vzoriek.



Graf 12 Produkcia β-karoténu a lykopénu kvasinkou *S. roseus*

U kvasinky *S. roseus* bolo najviac β-karoténu zisteného v kvasinkách stresovaných 2% NaCl a 5mM H₂O₂, dokonca viac než v kontrole. Hodnoty sú relatívne vysoké a sú zrovnateľné s kvasinkou *R. glutinis*. U zvyšných stresov bol obsah β-karoténu nižší než v kontrolnej vzorke. V podobnom duchu sú aj hodnoty pre lykopén.

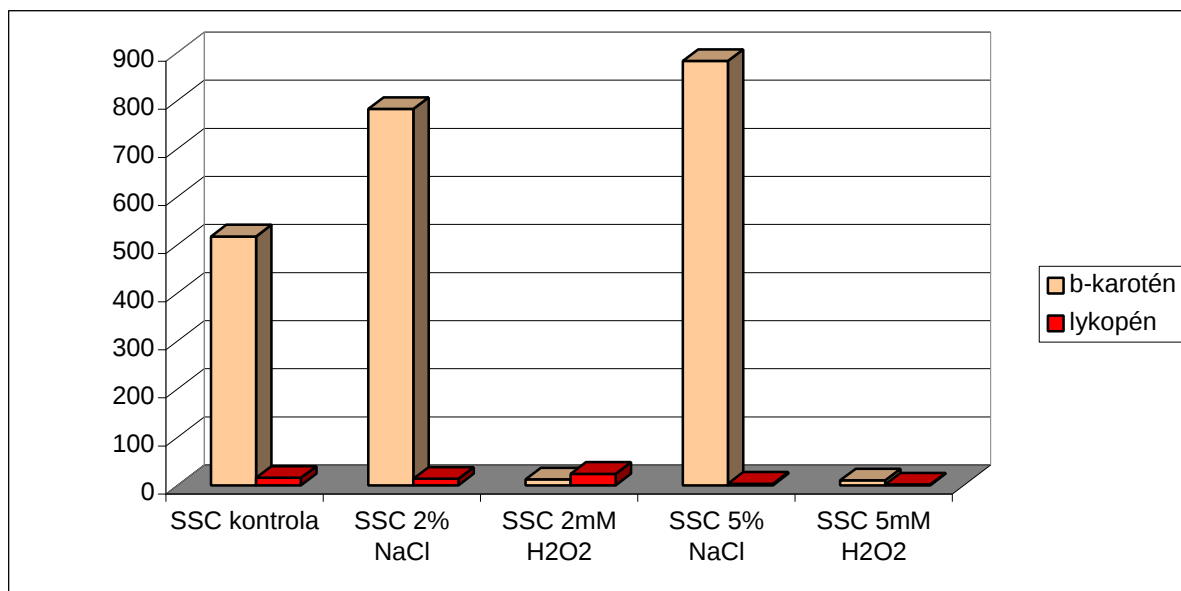
5.1.5.6 *Sporobolomyces shibatanus*

Súhrn nameraných dát pre kvasinku *Sporobolomyces shibatanus* je možné vidieť v Tab. 48.

Tab. 48 Súhrn analyzovaných metabolitov analyzovaných u kvasinky *S. shibatanus* vrátane množstva biomasy

stresový faktor	β-karotén	lykopén	biomasa
	µg /g sušiny	µg /g sušiny	g/l
kontrola	517,42	15,56	3,58
2% NaCl	782,66	13,65	2,82
2 mM H ₂ O ₂	12,29	24,07	2,39
5% NaCl	882,47	3,23	3,95
5 mM H ₂ O ₂	10,25	1,78	2,85

V tomto prípade došlo k malému nárastu biomasy aj u kontroly aj u stresovaných vzoriek. Oproti kvasinkám rodu *Rhodotorula* sa jedná o veľký rozdiel.



Graf 13 Produkcia β -karoténu a lykopénu kvasinkou *S. shibatanus*

U kvasinky *S. shibatanus* sú opäť viac použiteľné solné stresy, kde v oboch prípadoch došlo k vyššiemu podielu aj α - aj β -karoténu. Peroxidové stresy viedli k produkcii minimálneho množstva metabolitov, výnimkou je len lykopén u 2 mM H₂O₂, kde bola zaznamenaná najvyššia hodnota zo všetkých. Tento výsledok je dokladom, že peroxidový stres má negatívny vplyv na celkový metabolizmus a neumožňuje dostatečný priebeh biosyntézy karotenoidov, blokuje pravdepodobne celú izoprenoidnú dráhu.

Z týchto výsledkov je patrné, že kvasinky rodu *Sporobolomyces* sú horší producenti metabolitov, než kvasinky rodu *Rhodotorula*, naviac citlivejšie reagujú na vplyv exogénnych stresových faktorov. Vhodným stresovým faktorom je však možné dosiahnuť ciele produkciu metabolitov, ale stresový faktor musí byť zvolený na mieru každej kvasinke, nedá sa aplikovať jednotný postup na všetky kmene, pričom je potrebné brať ohľad na metabolizmus kvasiniek, pôvodné stanovisko, odkiaľ bola kvasinka izolovaná a z toho vyplývajúce adaptačné mechanizmy, ktoré v nej boli aktivované. Vplyv stresových faktorov na metabolizmus bol pozorovaný na zmenách proteómu, a to pomocou 2D elektroforézy (výsledky sú v kap. 5.1.4).

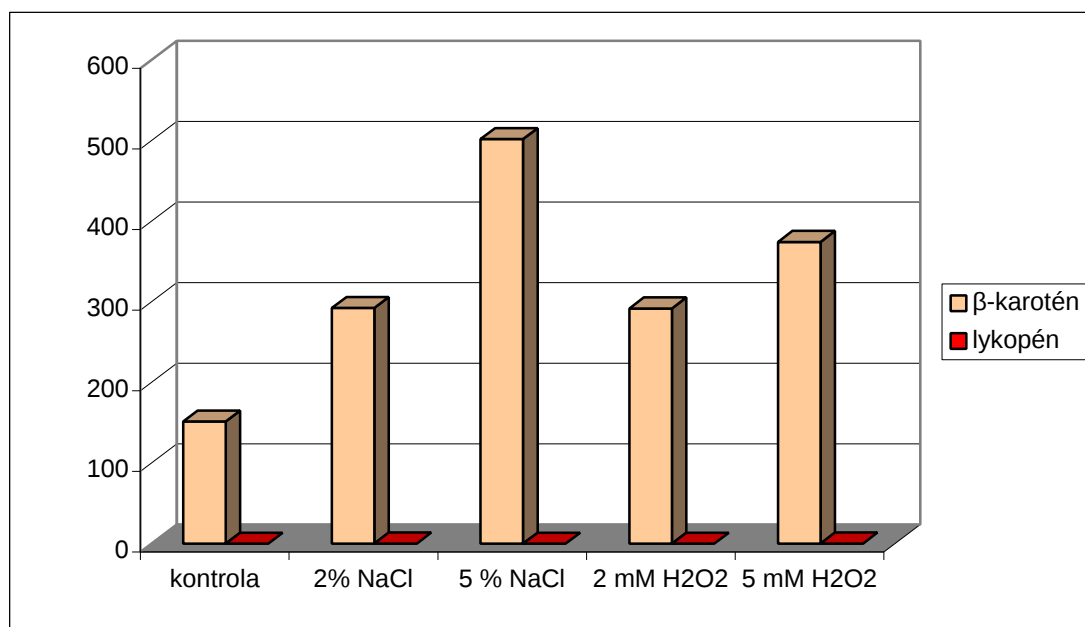
5.1.5.7 *Cystofilobasidium capitatum*

Metabolity kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* boli analyzované pre zrovnanie podobností a rozdielov oproti rodom *Rhodotorula* a *Sporobolomyces*. Súhrn nameraných dát je možné vidieť v Tab. 49, graficky spracované výsledky sú v grafe 14.

Tab. 49 Súhrn analyzovaných metabolitov analyzovaných u kvasinky *C. capitatum* vrátane množstva biomasy

stresový faktor	β-karotén	lykopén	biomasa
	μg /g sušiny	μg /g sušiny	g/l
kontrola	151,595	0,0302	8,04
2% NaCl	292,5039	0,2276	8,18
5 % NaCl	502,0043	0,095	6,86
2 mM H ₂ O ₂	291,8641	0,1028	7,98
5 mM H ₂ O ₂	374,3751	0,2159	8,39

Nárast biomasy pre kontrolu aj stresované vzorky o množstve 7 – 9 g/l sa dá považovať za primeranú hodnotu pre karotenogénne kmene.



Graf 14 Produkcia β-karoténu a lykopénu kvasinkou *C. capitatum*

Prídavok stresových faktorov do živného média sa prejavil na zvýšenej produkcii metabolitov. Podiel β-karoténu bol u všetkých stresovaných buniek vyšší než v kontrolnej vzorke. Najvyšší podiel bol nameraný u 5% NaCl, kde bol nárast oproti kontrole viac než trojnásobný. U 2% NaCl vzrástol podiel β-karoténu dvojnásobne. Prídavok 2mM a 5mM H₂O₂ do živného média spôsobil nárast β-karoténu tiež minimálne dvojnásobne.

Pri produkcii lykopénu sa ukázal pozitívny vplyv stresových faktorov, avšak celkovo je lykopén produkovaný len v minimálnom množstve (okolo 0,2 μg/g) pretože v rámci metabolickej dráhy je ďalej metabolizovaný. Najvyššie výťažky boli u 2% NaCl a 5mM H₂O₂, kde oproti kontrole došlo k nárastu až päťnásobne.

Celkovo je možné konštatovať, že produkčné vlastnosti kvasiniek rodu *Cystofilobasidium* sú podobné viacej rodu *Rhodotorula*, čo odpovedá aj taxonomickému zaradeniu (oba rody patria do

čelade Basidiomycetaleae). Reakcia na exogénny stres nevylučuje u cystofilobasidií prípadné biotechnologické využitie.

5.2 Analýza proteínov a antioxidačných látok v rastlinných vzorkách

Za účelom aplikácie metód analýzy proteínov boli v prvej časti predloženej práce podrobne analyzované proteíny z mikrobiálnych buniek kvasinkových kmeňov s potenciálnym biotechnologickým využitím. V ďalšom texte sú uvedené iné možnosti využitia analýzy proteínov pri charakterizácii metabolického stavu a odozvy organizmov na vonkajší stres. Ako materiál boli využité rastlinné tkanivá, pretože karotogénne kvasinky poskytujú v ďalej prevádzaných analýzach nízku odozvu a neprodukujú všetky zo sledovaných metabolitov.

Ako modelové organizmy pre sledovanie proteínového zloženia a následne enzýmovej aktivity individuálnych proteínov boli vybrané tkanivá ovocných plodov – konkrétne jablák vystavených exogénnemu stresu vo forme dlhodobého uchovávaní v atmosfére s regulovaným obsahom kyslíka. K analýze jedného z enzýmov zapojených v oxidačno-redukčnej rovnováhe rastlinných tkanív boli okrem jablák použité aj vzorky cereálií – konkrétne jačmeňa. V tomto prípade sa jednalo o dlhodobo skladovaný jačmeň, kde hladina sledovaného enzýmu súvisí s potenciálnou vnímavosťou k exogénnej pliesňovej infekcii pri dlhodobom skladovaní. Celkovo je táto časť zameraná najmä na optimalizáciu metód stanovenia aktivity enzýmových antioxidantov a na interpretáciu tých dát, ktoré sú zapojené do stresovej odozvy rastlinných organizmov.

5.2.1 Analýza proteínov z rastlinných vzoriek

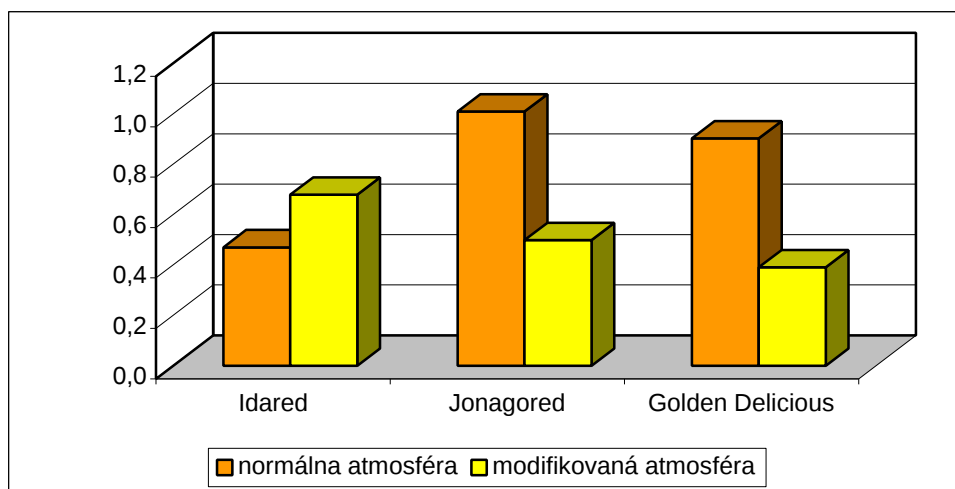
Jablká obsahujú pomerne malé množstvo proteínov, z antioxidačných enzýmov možno detekovať len niektoré – superoxiddismutázu, katalázu a polyfenoloxidázu. Na proteíny z jablák (kap. 4.3.2.1) boli aplikované rôzne metódy stanovenia, so zameraním na cieľ experimentov. Celkové proteíny boli stanovené Hartree-Lowryho metódou (kap. 4.4.1). Molekulová hmotnosť proteínov bola sledovaná pomocou mikročipovej elektroforézy (kap. 4.4.5). a tiež pomocou 1D elektroforézy (kap. 4.4.3). Pokusne bola prevedená aj presná identifikácia SOD pomocou metódy Western Blot (kap. 4.4.4).

5.2.1.1 Hartree-Lowryho metóda

Pre potvrdenie obsahu proteínov v jablkách, spomínaných v literatúre bol pomocou Hartree-Lowryho metódy (kap. 4.4.1) zmeraný celkový obsah proteínov vo vzorkách jablák (kap. 4.1.2.1). Keďže bolo možné vyextrahovať len rozpustné proteíny, tak obsah proteínov nie je úplne presný. Malý obsah celkových proteínov však zodpovedá tabuľkovým hodnotám v literatúre [125].

Tab. 50 Obsah rozpustných proteínov v jablkách (vzťahnuté na gram jedlého podielu jablka)

	rozpustné proteíny [mg/g]	
	normálna atmosféra	modifikovaná atmosféra
Idared	0,470	0,679
Jonagored	1,008	0,499
Golden Delicious	0,902	0,391



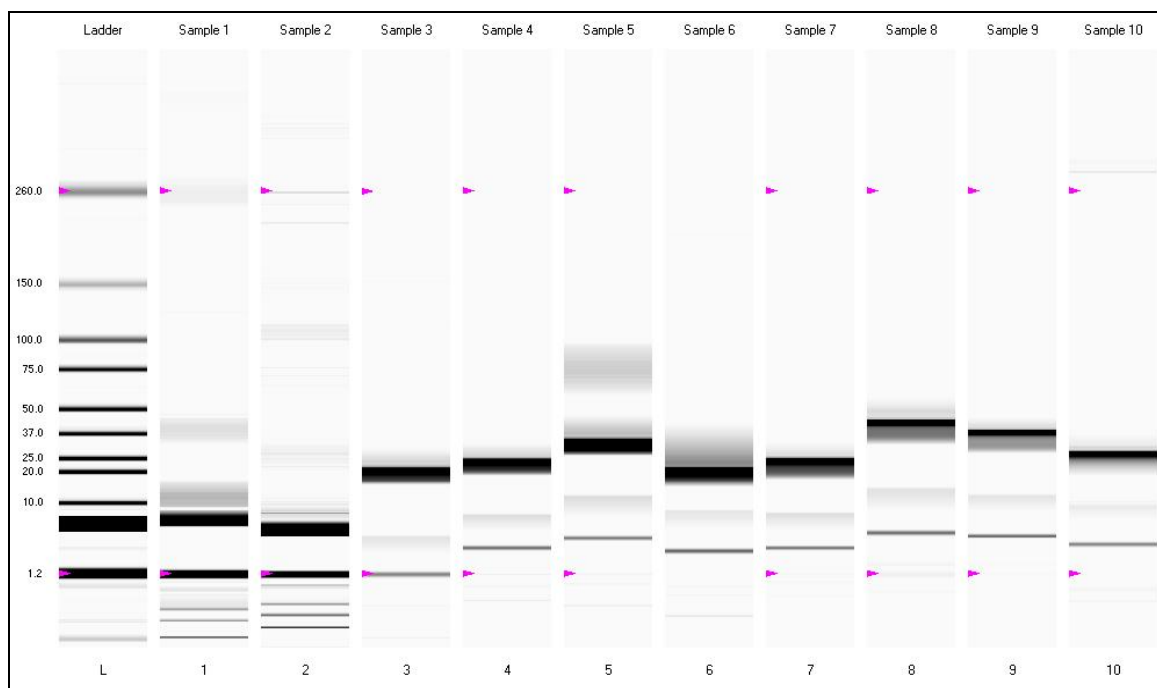
Graf 15 Obsah rozpustných proteínov vo vzorkách jablák, ktoré boli uchované v normálnej atmosfére a v modifikovanej atmosfére

Z výsledkov meraní je vidieť, že najviac rozpustných proteínov obsahuje odroda Jonagored, ktorá bola skladovaná v normálnej atmosfére. U druhu Idared malo skladovanie v modifikovanej atmosfére pozitívny vplyv na stav proteínov, zatiaľ čo na obsah proteínov u ostatných dvoch odrôd pôsobilo uskladnenie v modifikovanej atmosfére negatívne. Ak uvažujeme, že u odrôd Jonagored a Golden Delicious má skladovanie v normálnej atmosfére simulovať počiatočné podmienky pri zbere, tak je zrejmé, že v priebehu uchovania týchto odrôd v modifikovanej atmosfére došlo k zníženiu obsahu celkových rozpustných proteínov na polovicu.

Celkové proteíny boli stanovované najmä ako pomocný parameter pre hodnotenie enzýmových aktivít a proteínového zloženia v plodoch.

5.2.1.2 Analýza proteínov v jablkách pomocou mikročipovej elektroforézy

Analýzou na mikročipovej elektroforéze, prevedenej na mikročipe od firmy BioRad boli kvalitatívne určené rozpustné proteíny vo vzorkách jablák (kap. 4.1.2.1), ktoré boli pripravené podľa postupu popísaného v kap. 4.3.2.2. Vyhodnotenie prebehlo v programe Experion, ktorého výstupom sú grafy a tabuľky s hodnotami pre každú analyzovanú vzorku.



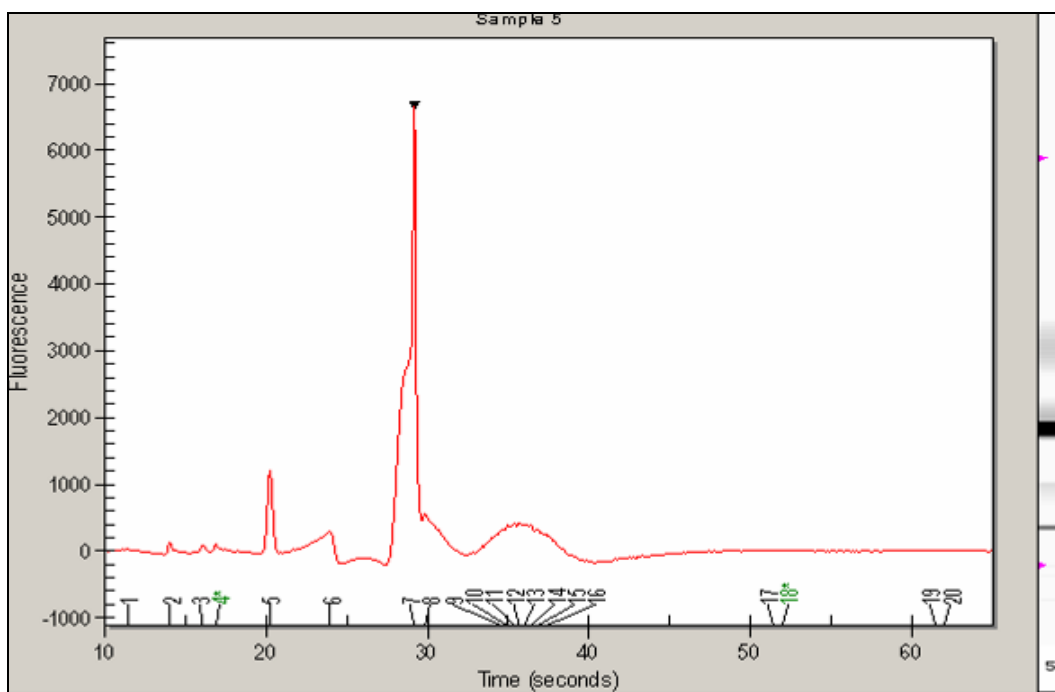
Obr. 67 Mikročipová elektroforéza všetkých odrôd jabĺk

Tab. 51 Popis nanášok k Obr. 67

dráha vzorky	popis vzorky
L	proteínový štandard
1	Idared (normálna atmosféra)
2	Idared (normálna atmosféra)
3	Golden Delicious (normálna atmosféra)
4	Golden Delicious (normálna atmosféra)
5	Jonagored (normálna atmosféra)
6	Jonagored (normálna atmosféra)
7	Idared (modifikovaná atmosféra)
8	Idared (modifikovaná atmosféra)
9	Golden Delicious (modifikovaná atmosféra)
10	Jonagored (modifikovaná atmosféra)

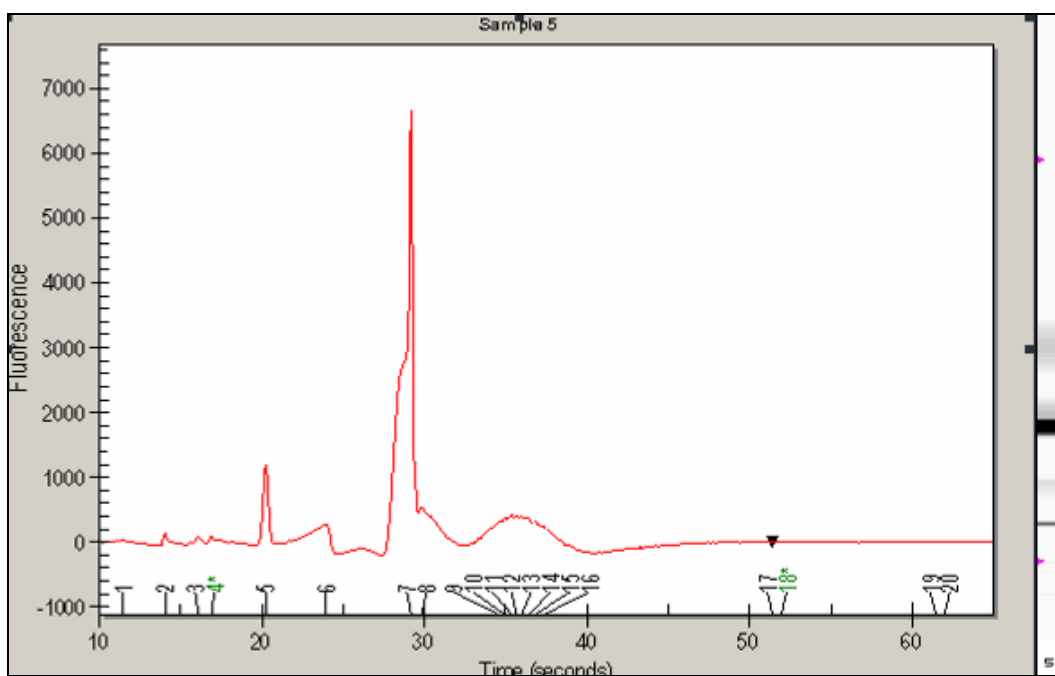
Predpokladalo sa, že proteínové profily jednotlivých odrôd sa nebudú od seba veľmi líšiť, preto na zistenie distribúcie proteínových frakcií bola vybraná ako reprezentatívna vzorka č.5 (Obr. 67) (vid' tiež príloha 2). Prioritne bola sledovaná prítomnosť enzýmov SOD, CAT a PPO. Po porovnaní molekulových hmotností jednotlivých proteínov s literatúrou boli naznačené možné zhody so vzorkou. SOD má molekulovú hmotnosť v rozmedzí 22 – 32,5 kDa v závislosti na type kovu v molekule [108]. Molekulová hmotnosť katalázy izolovanej z buniek cicavcov je v intervale 230 – 250 kDa [126]. Namerané molekulové hmotnosti ako výstup z programu po

mikročipovej elektroforéze sú v prílohe 3 na konci práce. Z dát vyplýva, že SOD by zodpovedal pík č.7 naznačený na Obr. 68, ktorý má podľa výsledkovej tabuľky molekulovú hmotnosť 34,04.



Obr. 68 Naznačený pík enzýmu SOD, výstup z programu Experion k mikročipovej elektroforéze

Kataláza bola identifikovaná ako pík číslo 17 o molekulovej hmotnosti 252,98, vid' naznačená šípka na Obr. 69.



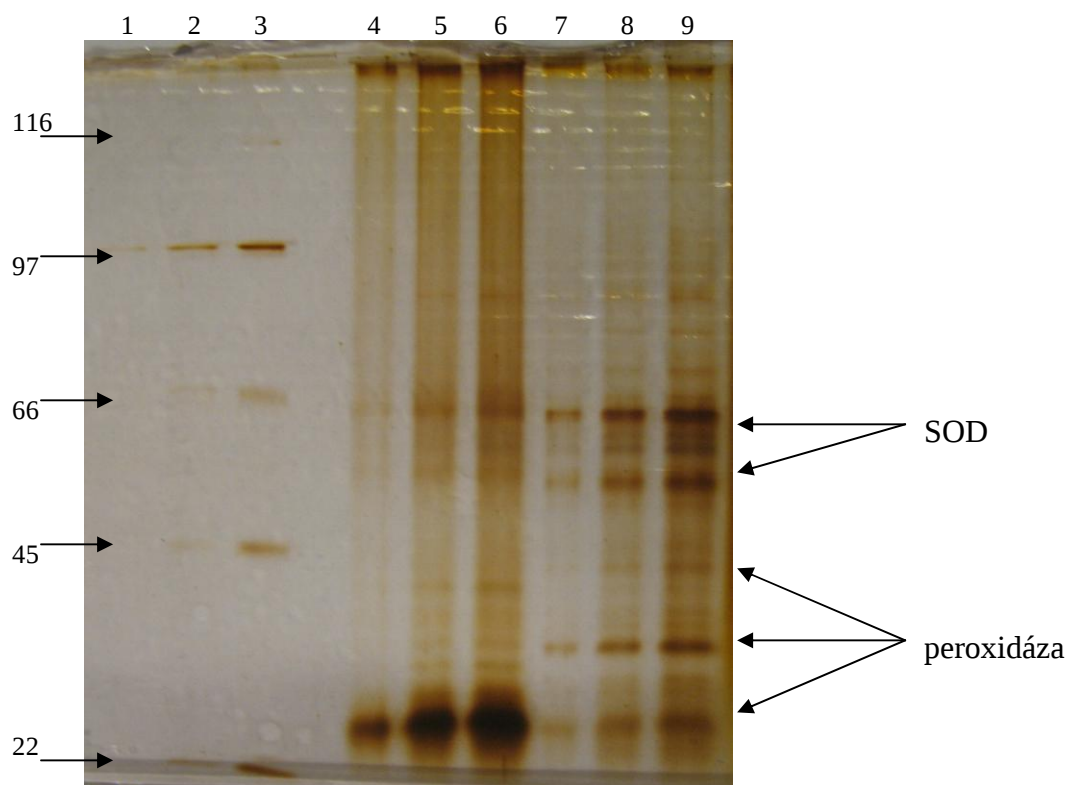
Obr. 69 Naznačený pík enzýmu CAT, výstup z programu Experion k mikročipovej elektroforéze

Enzým PPO sa pomocou mikročipovej elektroforézy nepodarilo identifikovať, keďže jeho molekulová hmotnosť je vysoká (cca 750 kDa pre enzým izolovaný z jablák [127]), tak táto hodnota je nad medzou detekcie mikročipovej elektroforézy.

Mikročipová elektroforéza udáva aj orientačné hodnoty obsahu proteínov vo vzorke. Na základe mikročipovej elektroforézy bol v analyzovaných vzorkách najväčší obsah enzýmu SOD. Ako však bude uvedené vo výsledkoch v kap. 5.2.2.1, počas enzýmovej analýzy bola zistená vo vzorkách vyššia aktivita u enzýmu kataláza. Rozdiel sa dá vysvetliť tým, že kataláza má molekulovú hmotnosť blízko medzi detekcie v mikročipovej elektroforéze, a preto môžu byť výsledky skreslené.

5.2.1.3 Analýza proteínov v jablkách pomocou 1D elektroforézy

Separácia proteínov z jablák pomocou 1D elektroforézy bola prevedená z čerstvej šťavy odrôd Golden Delicious a Šampión. Keďže v jablkách všeobecne nie je vysoký obsah proteínov, tak boli proteíny po separácii farbené striebrom, ktoré je citlivejšie. Vďaka nemu je možné detekovať aj nízke obsahy proteínov.



Obr. 70 1D elektroforéza proteínov z jablák

Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 120V, 2,5 hod

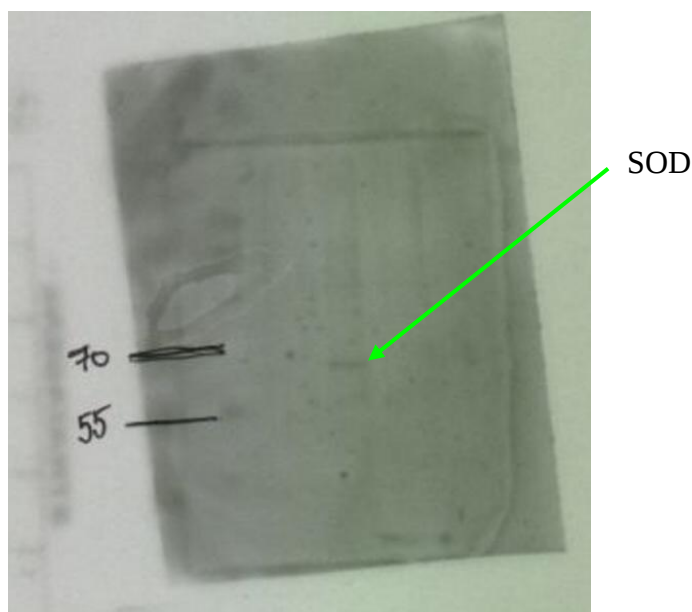
Tab. 52 Popis nanášok k Obr. 70

dráha vzorky	popis vzorky
1	komerčný štandard, široký rozsah (BioRad), 2 μ l (200; 116; 97; 66; 45; 22 kDa)
2	komerčný štandard, široký rozsah (BioRad), 5 μ l
3	komerčný štandard, široký rozsah (BioRad), 10 μ l
4	proteíny z odrody Golden delicious, 5 μ l
5	proteíny z odrody Golden delicious, 10 μ l
6	proteíny z odrody Golden delicious, 15 μ l
7	proteíny z odrody Šampión, 5 μ l
8	proteíny z odrody Šampión, 10 μ l
9	proteíny z odrody Šampión, 15 μ l

Celkový obsah proteínov v jablkách je pomerne nízky (kap. 5.2.1.1). Majoritnými proteínmi jabĺk sú antioxidačné enzýmy superoxiddismutáza, polyfenoloxidáza, kataláza a peroxidáza. Keďže kataláza a polyfenoloxidáza majú molekulové hmotnosti väčšie, než bol limit analýzy pomocou PAGE-SDS (230 – 250 kDa pre CAT [126], 750 kDa pre PPO [127]), neboli tým pádom identifikované. Ostatné zóny proteínov môžu patriť superoxiddismutáze, pretože okolo M_r 30 kDa [108] sa nachádza zóna proteínov, viditeľná najmä u vzorky Šampión. V tejto oblasti molekulovej hmotnosti by sa však mala nachádzať aj peroxidáza s molekulovou hmotnosťou 26 kDa, 34 kDa a 40 kDa pre jednotlivé izoméry [128]. Na géle sú viditeľné 3 zóny proteínov, ktoré by mohli patriť práve peroxidáze. Superoxiddizmutáza by tým pádom mohla byť výrazná zóna proteínov medzi 60 – 70 kDa. Túto teóriu by potvrdzoval aj výsledok Western blot analýzy, kde bol enzým superoxiddizmutáza izolovaný z jabĺk identifikovaný tiež v oblasti molekulovej hmotnosti 60 – 70 kDa (kap. 5.2.1.4).

5.2.1.4 Analýza proteínov v jablkách pomocou Western Blotu

Celá analýza bola prevedená podľa postupu popísaného v kap. 4.4.4. v spolupráci s laboratóriami Max F Perutz, Viedeň, oddelenie chromozómovej biológie. Výsledky nie sú presvedčivé, avšak z časových dôvodov nebolo možné analýzu zopakovať.



Obr. 71 Western blot vzoriek z jabĺk

Na výsledku western blot analýzy by mal byť enzým superoxiddismutáza. Podľa literatúry [108] by ale jeho molekulová hmotnosť mala byť okolo 30 kDa.

5.2.2 Enzýmová analýza

5.2.2.1 Analýza antioxidačných enzýmov vo vzorkách jabĺk

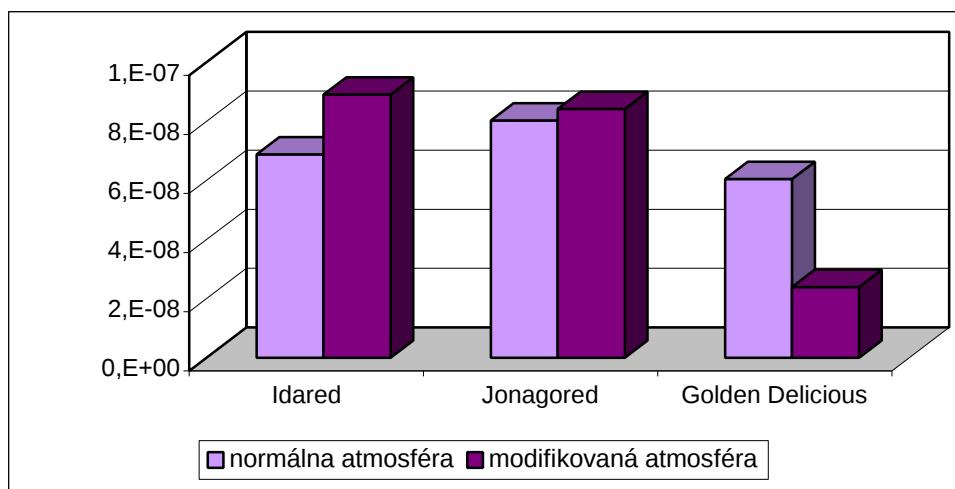
Vo vzorkách jabĺk (kap. 4.1.2.1) boli analyzované aktivity antioxidačných enzýmov – superoxiddismutázy (SOD), katalázy (CAT) a polyfenoloxidázy (PPO). Vzorky pre analýzu boli pripravené podľa postupu v kap. 4.3.2.2 a postupy analýz všetkých enzýmov sú popísané v kap. 4.4.8.1.

Stanovenie SOD

Enzým SOD bol stanovený pomocou kitu Ransod od firmy Randox. Kvôli finančnej náročnosti bola každá vzorka analyzovaná len dvakrát, a preto výsledky nie sú vyhodnotené štatisticky. Po nameraní boli hodnoty prepočítané na aktivitu v medzinárodných jednotkách (množstvo premeneného substrátu v μmol za jednotku času v minútach) a v kataloch (množstvo premeneného substrátu v moloch za jednotku času v sekundách) v grame jedlého podielu jablka. Hodnoty aktivít sú uvedené v Tab. 53.

Tab. 53 Aktivity SOD v jednotlivých odrodách jabĺk v gramoch jedlého podielu

	normálna atmosféra		modifikovaná atmosféra	
	U [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	katal [mol/s]	U [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	katal [mol/s]
Idared	4,130	$6,883 \cdot 10^{-8}$	5,346	$8,911 \cdot 10^{-8}$
Jonagored	4,817	$8,028 \cdot 10^{-8}$	5,054	$8,424 \cdot 10^{-8}$
Golden Delicious	3,629	$6,048 \cdot 10^{-8}$	1,437	$2,395 \cdot 10^{-8}$



Graf 16: Porovnanie hodnôt SOD v jednotlivých odrodách jablák (v kataloch)

Graf 16 udáva hodnoty aktivít enzýmu SOD v troch skúmaných odrodách jablák porovnávajúc dva druhy skladovacích atmosfér. Najvyššia aktivita SOD bola nameraná u odrody Idared vo vzorke uchováanej v modifikovanej atmosfére. Potvrzuje to teóriu, že modifikovaná atmosféra je vhodná na uchovanie čo najväčšieho množstva antioxidačných látok. Najnižšia aktivita bola naopak u vzorky Golden Delicious, opäť uchováanej v modifikovanej atmosfére. Rozdiel v aktivitách môže byť spôsobený nevhodným termínom zberu danej odrody. Aktivita SOD v odrode Jonagored bola pri uchovaní v modifikovanej atmosfére na podobnej úrovni ako odroda Idared.

Pri porovnaní aktivít SOD u jablák uchovávaných v normálnej atmosfére vykazovala najlepšie výsledky odroda Jonagored, za ktorou bola v tesnom závесе odroda Idared. Najmenšiu aktivitu vykázala opäť odroda Golden Delicious.

Ak budeme vychádzať z predpokladu, že skladovanie jablák v modifikovanej atmosfére je pre zachovanie SOD najvhodnejšie a že, pri značnom zjednodušení, aktivita enzýmu pri dlhodobom uchovávaní klesá vo všetkých odrodách rovnako rýchlo, môžeme sumarizovať, že v červených odrodách (Idared, Jonagored) je SOD zastúpené viac než v zelených odrodách (Golden Delicious). Tiež je možné uvažovať, že v normálnej atmosfére dochádza k degradácii enzýmu u odrody Idared rýchlejšie než u jablák Jonagored.

Stanovenie CAT

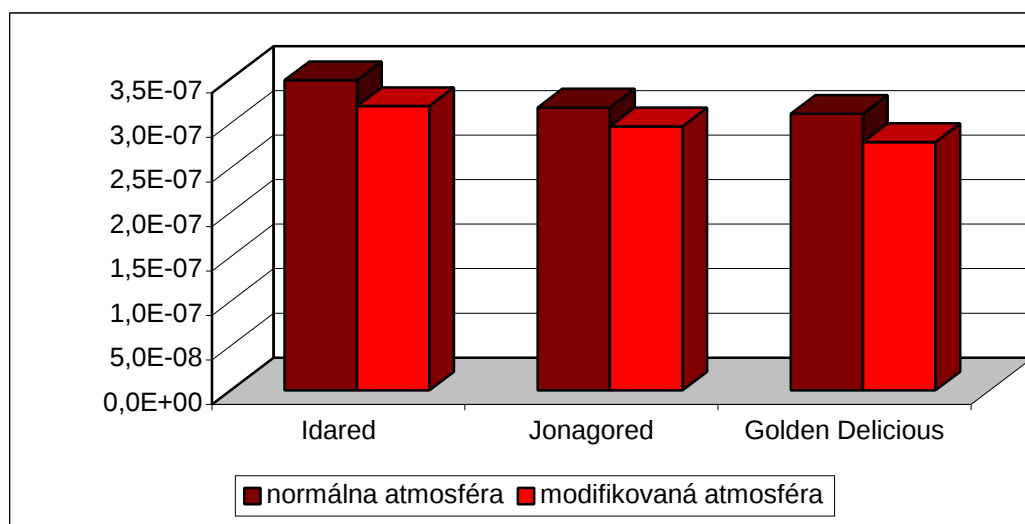
Vo všetkých dodaných odrodách bol stanovovaný aj enzým kataláza. Aktivita bola meraná 3x, výsledky sú zhrnuté v nasledovných tabuľkách.

Tab. 54 Priemerné výsledky stanovenia katalázy v odrodách skladovaných v normálnej atmosfére, prepočítané na gram jedlého podielu

	priemer U [μmol/min]	priemer katal [mol/s]	smerodatná odchýlka U	smerodatná odchýlka katal
Idared	20,918	$3,486 \cdot 10^{-7}$	0,904	$1,507 \cdot 10^{-8}$
Jonagored	19,068	$3,178 \cdot 10^{-7}$	0,523	$8,720 \cdot 10^{-9}$
Golden Delicious	17,383	$3,109 \cdot 10^{-7}$	0,495	$3,718 \cdot 10^{-8}$

Tab. 55 Priemerné výsledky stanovenia katalázy v odrodách skladovaných v modifikovanej atmosfére, prepočítané na gram jedlého podielu

	priemer U [μmol/min]	priemer katal [mol/s]	smerodatná odchýlka U	smerodatná odchýlka katal
Idared	19,175	$3,196 \cdot 10^{-7}$	1,769	$2,948 \cdot 10^{-8}$
Jonagored	17,796	$2,966 \cdot 10^{-7}$	1,131	$1,885 \cdot 10^{-8}$
Golden Delicious	16,741	$2,790 \cdot 10^{-7}$	0,837	$1,395 \cdot 10^{-8}$



Graf 17: Porovnanie hodnôt CAT v jednotlivých odrodách jablák (v kataloch)

Z výsledkov je patrné, že aktivita katalázy bola vyššia vo vzorkách uchovávaných v normálnej atmosfére. Vzorky uchovávané v modifikovanej atmosfére vykazovali nižšie hodnoty aktivít. Dá sa predpokladať, že jablká skladované v normálnej atmosfére majú viac aktivované antioxidačné systémy. Najvyššiu aktivitu vykazovala odroda Idared, následne odroda Jonagored a najmenšiu aktivitu zo sledovaných vzoriek mala odroda Golden Delicious. Rozdiely však nie sú tak znateľné ako napríklad u enzýmu SOD. Ak predpokladáme, že plody z normálnej atmosféry simulujú situáciu po odtrhnutí jablka, tak môžeme povedať, že v červených odrodách (Idared a Jonagored) je enzým kataláza zastúpený vo väčšom množstve než v odrodách zelených (Golden Delicious).

Stanovenie PPO

Vo vzorkách jablák bol stanovovaný aj enzým polyfenoloxidáza. Namerané dáta sú považované len za orientačné, pretože v dobe meraní nebola metóda stanovenia dostatočne overená. Práca s PPO je veľmi náročná, jeho aktivita na vzduchu rýchlo klesá, v závislosti na množstve prítomných substrátov v biologickom materiáli. V jablkách sú pre PPO vhodnými substrátmi katechín, epikatechín a kyselina chlorogenová. Ich oxidáciou dochádza k nežiadúcemu hnednutiu dužiny [104]. Tiež substrát používaný na stanovenie aktivity enzýmu (methylkatechol) na vzduchu oxidoval, preto musel byť spoločne so vzorkami uchovávaný za temna. Práve pre stanovenie PPO bola dôležitá úprava vzorky pomocou Tritonu X-100 a polyvinylpyrolidonu (kap. 4.3.2.2). PPO sa totiž silno viaže na membrány. Preto si extrakcia enzýmu vyžaduje použitie detergentu. Druhý problém v izolácii enzýmu je prítomnosť chinónov a ich endogénnych fenolických prekursorov surovom extrakte enzýmu. Je dôležité minimalizovať tvorbu formovanie chinónov, ktoré môžu reagovať s enzýmom, výsledkom čoho sú straty v aktivite enzýmu. Tento problém rieši použitie polyvinylpyrolidonu, ktorý naväzuje fenoly [104].

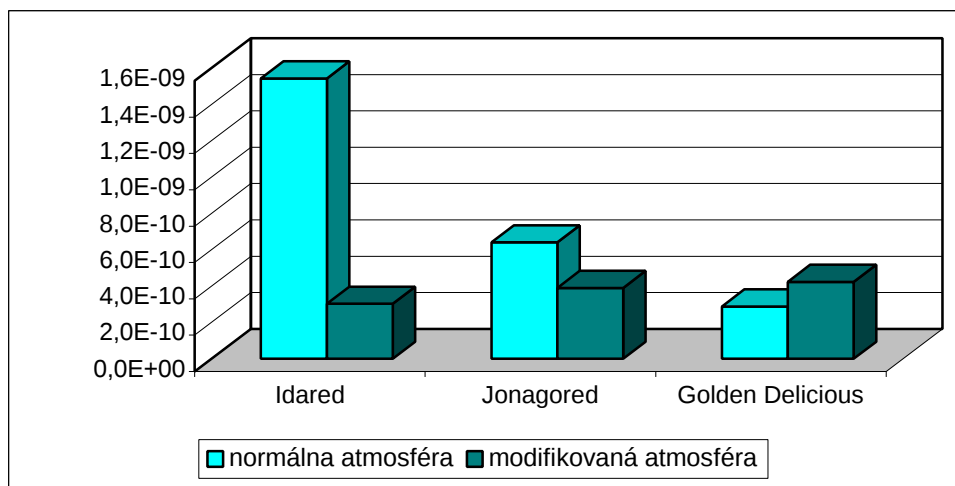
Aktivita bola meraná 3x, v tabuľkách sú zhrnuté priemerné hodnoty všetkých stanovení.

Tab. 56 Priemerné hodnoty PPO v odrodách skladovaných v normálnej atmosfére, prepočítané na gram jedlého podielu

	priemer U [μmol/min]	priemer katal [mol/s]	smerodatná odchylka U	smerodatná odchylka katal
Idared	0,093	$1,543 \cdot 10^{-9}$	$9,735 \cdot 10^{-3}$	$1,622 \cdot 10^{-10}$
Jonagored	0,038	$6,405 \cdot 10^{-10}$	$1,677 \cdot 10^{-3}$	$2,795 \cdot 10^{-11}$
Golden Delicious	0,017	$2,874 \cdot 10^{-10}$	$5,369 \cdot 10^{-3}$	$8,948 \cdot 10^{-11}$

Tab. 57 Priemerné hodnoty PPO v odrodách skladovaných v modifikovanej atmosfére, prepočítané na gram jedlého podielu

	priemer U [μmol/min]	priemer katal [mol/s]	smerodatná odchylka U	smerodatná odchylka katal
Idared	0,018	$3,031 \cdot 10^{-10}$	$7,412 \cdot 10^{-4}$	$1,235 \cdot 10^{-11}$
Jonagored	0,023	$3,898 \cdot 10^{-10}$	$4,198 \cdot 10^{-3}$	$6,997 \cdot 10^{-11}$
Golden Delicious	0,025	$4,234 \cdot 10^{-10}$	$7,055 \cdot 10^{-3}$	$1,176 \cdot 10^{-10}$



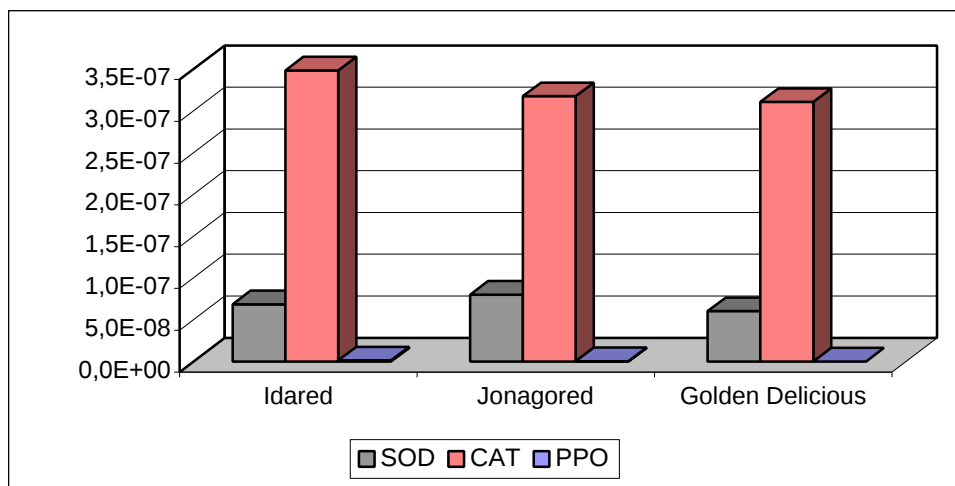
Graf 18: Porovnanie hodnôt PPO v jednotlivých odrodách jabĺk, v kataloch

Pri porovnaní vzoriek je jasné, že najvyšší obsah PPO bol v odrode Idared uskladnenej v normálnej atmosfére. Najmenšia aktivita bola nameraná v odrode Golden Delicious, ktorá bolo skladovaná v normálnej atmosfére. U odrôd Idared a Jonagored má regulovaná atmosféra skôr negatívny vplyv na aktivitu PPO, u odrody Golden Delicious má naopak pozitívny vplyv. Dôvodom môže byť zvýšená mobilizácia obranných enzýmových systémov v červených odrodách jabĺk vo fáze postupnej degradácie plodov. Použité červené odrody majú totiž kratšiu dobu uchovateľnosti, než zelená odroda.

Ak predpokladáme, že aktivita PPO nameraná vo vzorkách uchovaných v normálnej atmosfére simuluje podmienky pri zbere (okrem odrody Golden Delicious), môžeme uvažovať, že aktivita enzýmu v modifikovanej atmosfére je nižšia u odrody Idared než u odrody Jonagored. Tiež môžeme povedať, že v červenej odrode Idared je oveľa viac enzýmu PPO než v druhej červenej odrode Jonagored. Tieto výsledky sú ďalším dokladom pre pravdepodobnú úlohu PPO v obrannom systéme chrániacom plody pred poškodením oxidáciou.

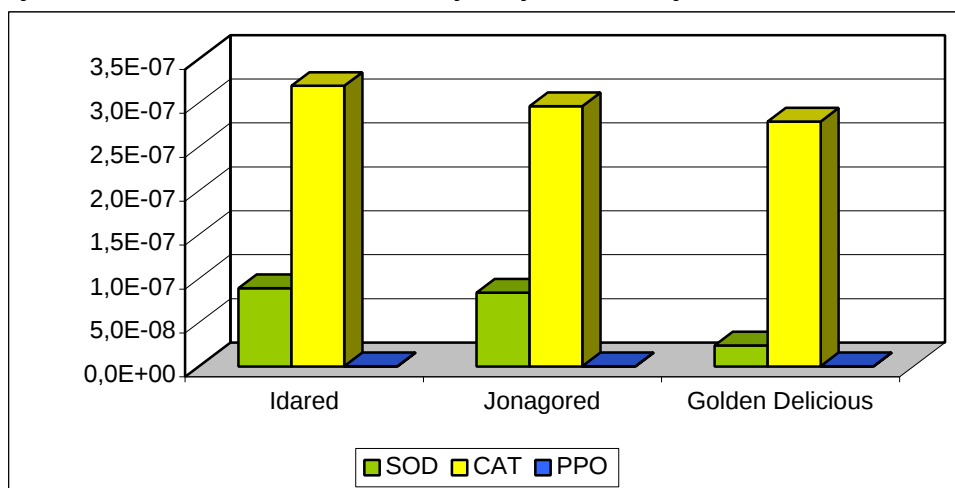
Porovnanie enzýmov v jednotlivých odrodách

Pre lepšie vyhodnotenie a väčšiu prehľadnosť je v nasledovných tabuľkách uvedené porovnanie aktivít všetkých enzýmov v jednotlivých odrodách.



Graf 19 Porovnanie enzýmových aktivít v jednotlivých odrodách skladovaných v normálnej atmosfére

Najvyššia aktivita bola zaznamenaná vo všetkých troch odrodách u enzýmu kataláza, ako druhý v poradí je enzým superoxiddizmutáza a najmenšiu aktivitu vykazovala polyfenoloxidáza. Čo sa odrôd týka, tak najvyššiu enzýmovú aktivitu celkovo vykazovala odroda Idared, kde boli namerané najvyššie hodnoty u CAT a PPO. U odrody Jonagored bola nameraná najvyššia hodnota SOD. Najmenšie hodnoty v celkovom meradle vykazovala odroda Golden Delicious. Tieto hodnoty môžu mať súvis s uchovávaním odrôd, kde červené odrody sú uchovávané kratšie, než odrody zelené. Nižšia uchovávateľnosť môže súvisieť s vyššími hodnotami aktivít, pretože u jablák dochádza k aktivácii obranných systémov, najmä CAT a PPO.



Graf 20: Porovnanie enzýmových aktivít v jednotlivých odrodách skladovaných v modifikovanej atmosfére

U vzoriek uchovávaných v modifikovanej atmosfére je vidieť podobný výsledok ako u jablák z normálnej atmosféry – najvyššie aktivity boli zaznamenané u CAT. Druhým enzýmom v poradí je SOD a najmenšie aktivity vykazovala PPO. Na aktivitu antioxidantných enzýmov má okrem odrodových vlastností vplyv aj stupeň zrelosti plodu počas zberu. Významnú úlohu zohráva aj

prítomnosť nízkomolekulových antioxidantov, ktoré napomáhajú regenerovať enzýmové antioxidanty. Z výsledkov potom vyplýva, že červená odroda Idared vykazuje najviac antioxidačných látok rôznych typov, čo môže znamenať najvyšší stupeň zrelosti a zároveň najvyššiu mieru mobilizácie obranných systémov v bunkách pred deštrukciou plodu. Týmto výsledkom by zodpovedali nižšie namerané hodnoty väčšiny antioxidantov u plodov skladovaných v modifikovanej atmosfére.

5.2.2.2 Analýza antioxidačných enzýmov vo vzorkách jačmeňov a sladov

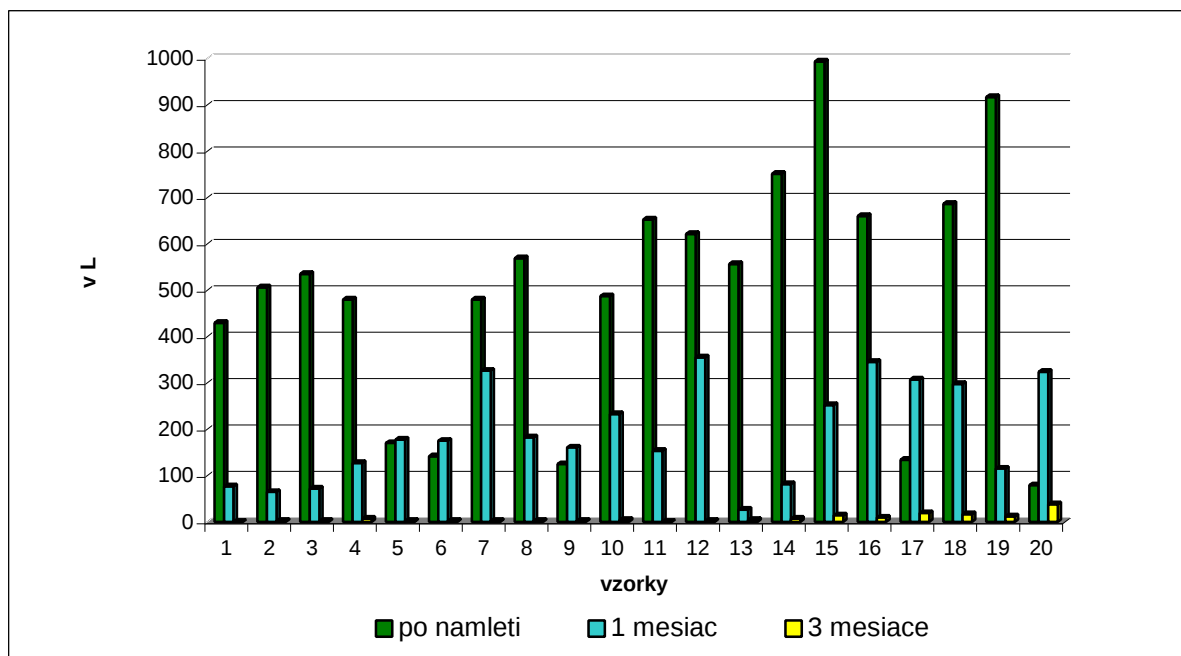
Stanovenie LOX

Enzým lipoxygénáza (LOX) bol stanovovaný v 20 vzorkách jačmeňa (kap. 4.1.2.2) a po procese skladovania aj v následných vzorkách sladu v rámci projektu „Studium enzymatické aktivity pro zlepšení biologického potenciálu jarního sladovnického ječmene“. Čiastočným cieľom práce bolo zaznamenať aktivitu LOX (kap. 4.4.8.2) vo všetkých odrodách jačmeňa a sladu, keďže časť odrôd bola nová a dovtedy netestovaná. Z technologického hľadiska totiž ovplyvňuje výskyt LOX senzorickú kvalitu piva, keďže sa enzým ťažko inaktivuje a jeho aktivita je vysoká aj pri nízkych teplotách [129].

Súčasťou experimentu bolo sledovanie zmien enzýmovej aktivity jednotlivých jačmeňov a sladov v čase, tj. ihneď po dodaní vzorky a jej spracovaní, po 1 mesiaci a po 3 mesiacoch. Najvyššie aktivity boli zaznamenané vo vzorkách hneď po dodaní, čo je vidieť aj na priloženom grafe. Doba skladovania významne vplýva na aktivitu izoformy LOX-1 [132], preto všetky ďalšie analýzy boli prevedené hneď po dodaní vzoriek.

Tab. 58 Zmeny aktivity LOX-1 z jačmeňa počas skladovania

vzorka		aktivita ($\mu\text{mol}/\text{min}$ v L)			vzorka		aktivita ($\mu\text{mol}/\text{min}$ v L)		
		po namletí	1 mes.	3 mes.			po namletí	1 mes.	3 mes.
1	Wikingett	429,6	76,8	0	11	Marthe	652,8	153,6	0
2	Troon	506,4	64,8	2,4	12	Maltasia	621,6	355,2	2,4
3	Cruiser	535,2	72	2,4	13	Lissane	556,8	26,4	4,8
4	Bellevue	480	127,2	7,2	14	Musikant	751,2	81,6	7,2
5	Biatlon	170,4	177,6	2,4	15	Xanadu	993,6	252	14,4
6	Mauritia	141,6	175,2	2,4	16	Jersey	660	345,6	9,6
7	Ebson	480	326,4	2,4	17	Malvaz	134,4	307,2	19,2
8	NFC Tipple	568,8	182,4	2,4	18	Binder	686,4	297,6	16,8
9	Westminster	124,8	160,8	2,4	19	Tepelský	916,8	115,2	12
10	Publican	487,2	232,8	4,8	20	Ratbořský	79,2	324	38,4

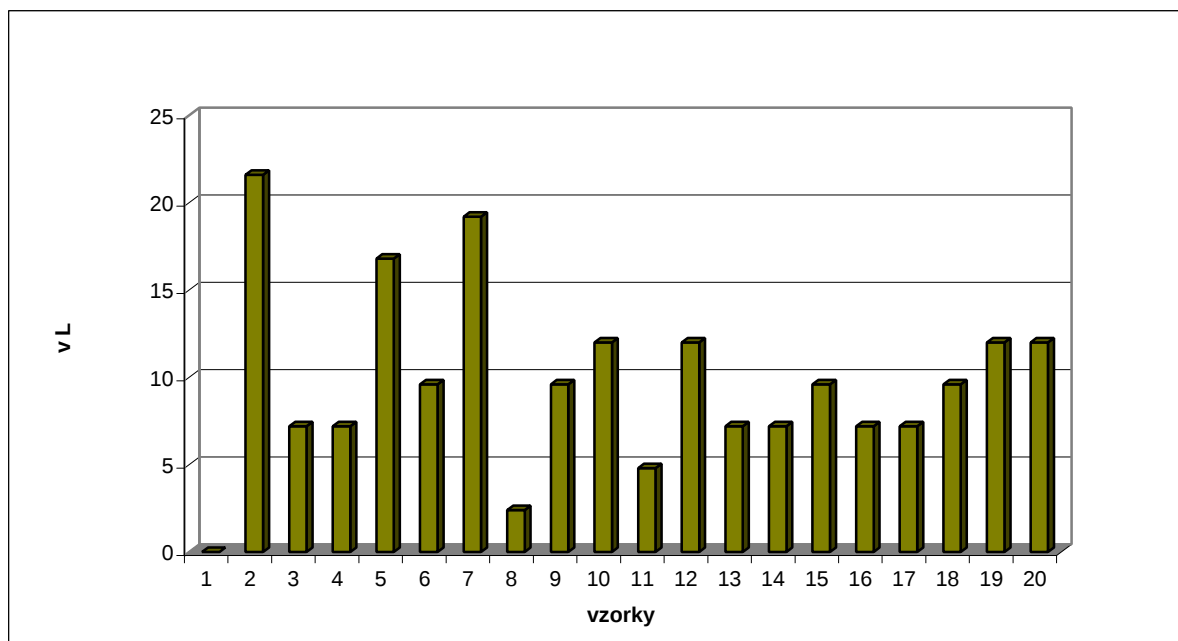


Graf 21 Zmeny aktivity LOX-1 v jačmeni počas skladovania

Vysoké hodnoty LOX-1 boli namerané najmä vo vzorkách 15 (Xanadu), 19 (Tepelský), 14 (Musikant), 16 (Jersey), 18 (Binder) a 11 (Marthe). Najväčší pokles aktivity enzýmu bol zaznamenaný u vzoriek, u ktorých bola po namletí nameraná najvyššia aktivita. Cieľom je vyšľachtiť postupne taký jačmeň, ktorý bude mať minimálne obsahy LOX-1.

Tab. 59 Aktivita LOX-1 vo vzorkách sladov

vzorka		aktivita ($\mu\text{mol/min v L}$)	vzorka		aktivita ($\mu\text{mol/min v L}$)
1	Wikingett	0	11	Marthe	4,8
2	Troon	21,6	12	Maltasia	12
3	Cruiser	7,2	13	Lissane	7,2
4	Bellevue	7,2	14	Musikant	7,2
5	Biatlon	16,8	15	Xanadu	9,6
6	Mauritia	9,6	16	Jersey	7,2
7	Ebson	19,2	17	Malvaz	7,2
8	NFC Tipple	2,4	18	Binder	9,6
9	Westminster	9,6	19	Tepelský	12
10	Publican	12	20	Ratbořský	12



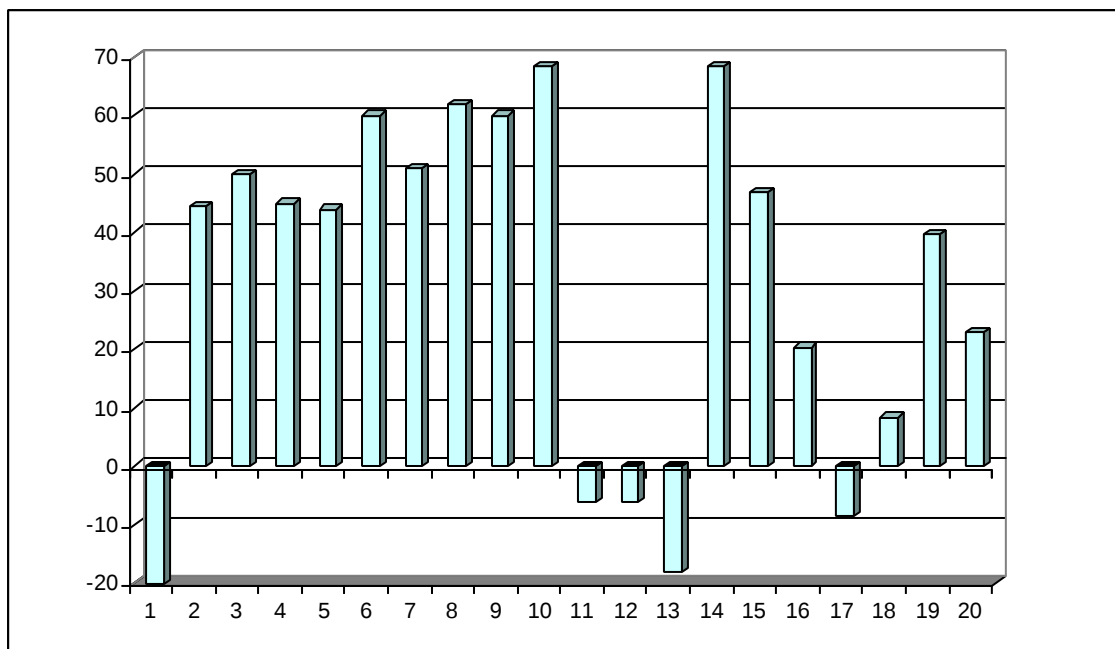
Graf 22 Aktivita LOX-1 vo vzorkách sladov

Aktivita LOX-1 v slade bola 2 – 3x vyššia než vo vzorkách jačmeňa. Tu však nie sú známe presné podmienky skladovania, keďže boli dodávané treťou stranou (VÚPS). Najvyššia aktivita bola zistená vo vzorkách 1 (Wikingett), 5 (Biatlon) a 7 (Ebson).

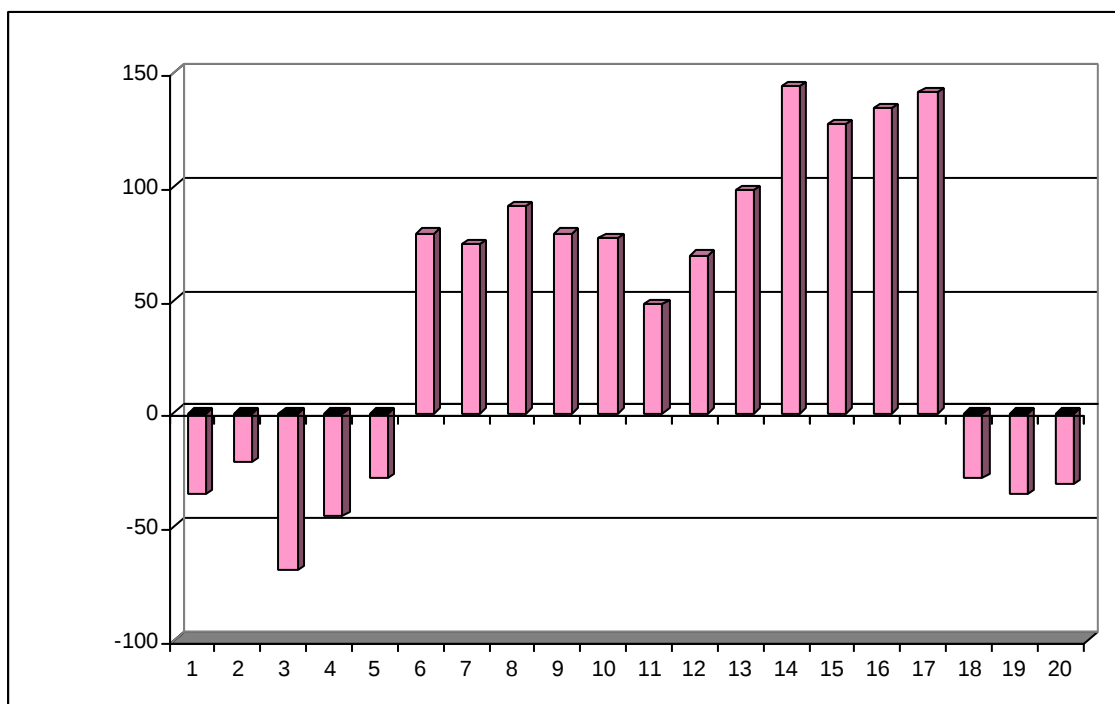
Jačmeň aj slad môžu prirodzene obsahovať látky, ktoré majú inhibičný efekt na pôsobenie LOX [133]. Preto bol testovaný inhibičný efekt dodatočnými prídavkami štandardu LOX do vzoriek jačmeňov a sladov.

Tab. 60 Percento inhibície u jačmeňov a sladov

vzorka		% inhibície		vzorka		% inhibície	
		jačmeň	slad			jačmeň	slad
1	Wikingett	-20	-36	11	Marthe	-6	48
2	Troon	44,4	-21,6	12	Maltasia	-6	69,6
3	Cruiser	50	-69,6	13	Lissane	-18	98,4
4	Bellevue	45	-45,6	14	Musikant	68,4	144
5	Biatlon	44	-28,8	15	Xanadu	46,8	127,2
6	Mauritia	60	79,2	16	Jersey	20,4	134,4
7	Ebson	51	74,4	17	Malvaz	-8,4	141,6
8	NFC Tipple	62	91,2	18	Binder	8,4	-28,8
9	Westminster	60	79,2	19	Tepelský	39,6	-36
10	Publican	68,4	76,8	20	Ratbořský	23	-31,2



Graf 23 Inhibičná aktivita vzoriek jačmeňov



Graf 24 Inhibičná aktivita vzoriek sladov

Inhibičná aktivita extraktov sladu bola 2 – 3x vyššia než inhibičná aktivita u extraktov jačmeňov. Vo väčšine vzoriek s vyššou aktivitou LOX bol zaznamenaný tiež vysoký inhibičný efekt voči štandardnému prípravku LOX.

5.2.3 Analýza ostatných antioxidačných látok z rastlinných vzoriek

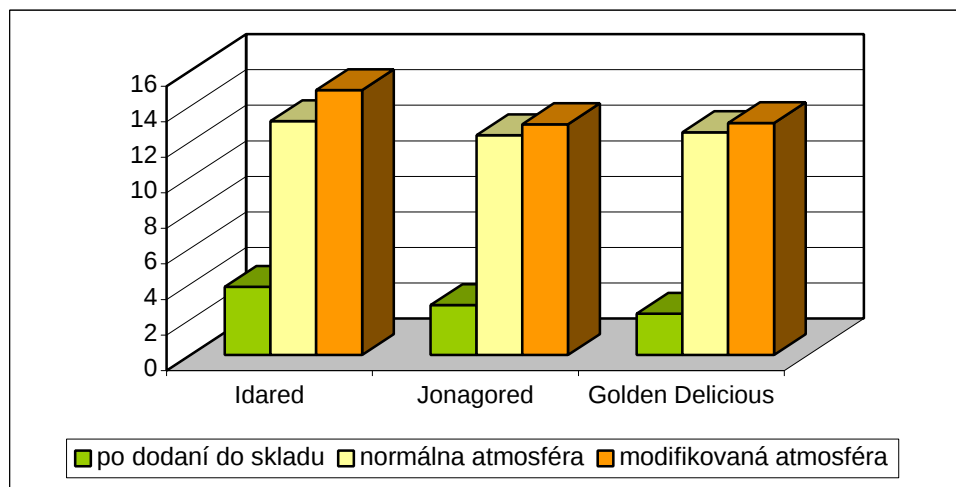
5.2.3.1 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity

Jablká

Podľa postupu popísaného v kap. 4.5.4 bola stanovená celková antioxidačná aktivita vo vzorkách jabĺk pomocou kitu TAS od firmy Randox. Meranie bolo prevedené na vzorkách, ktoré boli čerstvo dodané a tiež vo vzorkách, ktoré boli 158 dní uložené v modifikovanej alebo normálnej atmosfére.

Tab. 61: Výsledky merania ABTS pre jablká dodané čerstvo a po 158 dňoch skladovania

	ABTS [$\mu\text{mol/g}$]		
	po dodaní	po 158 dňoch	
		normálna atmosféra	modifikovaná atmosféra
Idared	3,836	13,151	14,894
Jonagored	2,815	12,365	12,983
Golden Delicious	2,321	12,533	13,039



Graf 25 Porovnanie hodnôt celkovej antioxidačnej aktivity v jablkách dovezených za čerstva a po 158 dňoch skladovania

Z výsledkov je patrné, že všetky vzorky mali najnižšiu celkovú antioxidačnú aktivitu po dodaní jabĺk za čerstva. Toto mohlo byť spôsobené nedostatočnou zrelosťou počas zberu, čomu by potom zodpovedali aj vyššie hodnoty u jabĺk, ktoré boli uchovávané v atmosférach. U týchto vzoriek boli hodnoty TAS oveľa vyššie, keďže jablká dozreli až v sklade. Ďalším vplyvom môžu byť disimilačné procesy a vyplavovanie v bunke viazaných látok pod ich vplyvom. Vo všetkých troch prípadoch bola najvyššia aktivita zaznamenaná u vzoriek uchovaných v modifikovanej atmosfére, úplne najviac u odrody Idared. U vzoriek dodaných za čerstva mali obe červené

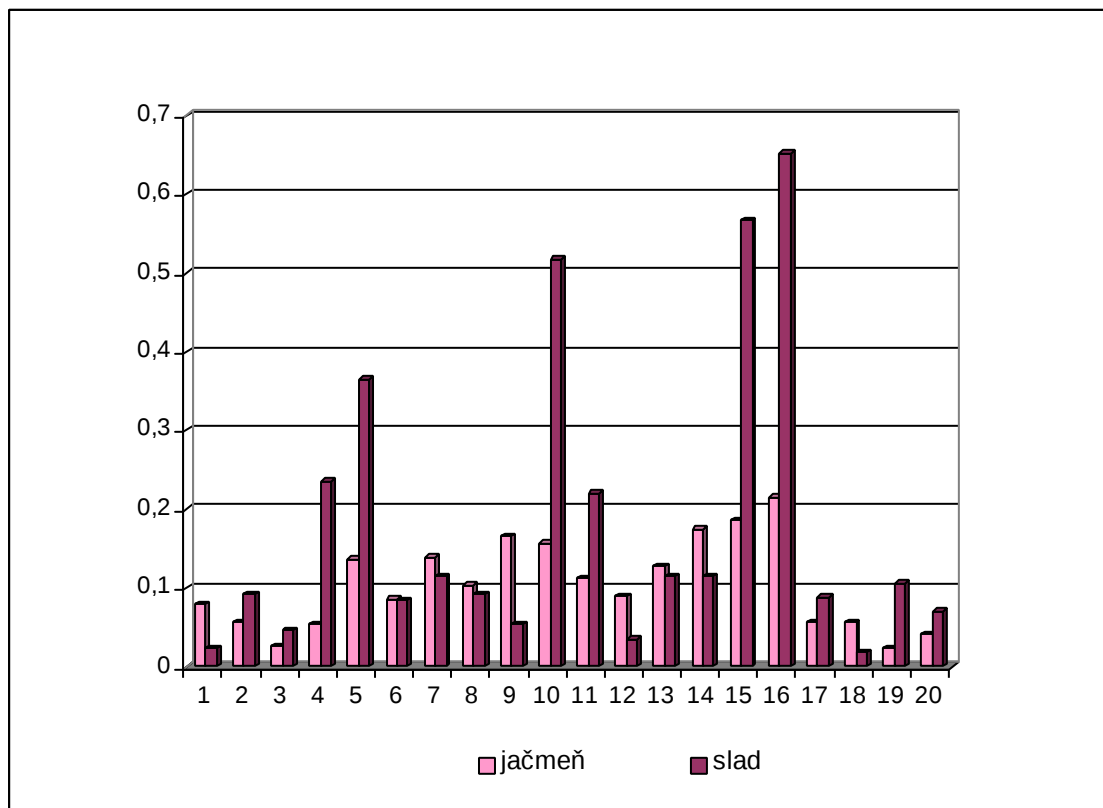
odrody (Idared, Jonagored) väčšiu hodnotu TAS než odroda zelená (Golden Delicious). Pomery boli následkom skladovania zmenené, pričom najvyššia hodnota TAS ostala u odrody Idared.

Jačmene a slady

Podľa postupu popísaného v kap. 4.5.4 bola stanovená celková antioxidačná aktivita v 20 vzorkách jačmeňov a následne aj sladov pomocou kitu TAS od firmy Randox. Výsledky sú uvedené v Tab. 62.

Tab. 62 Antioxidačná aktivita u vzoriek jačmeňov a sladov

vzorka		ABTS [mmol/l]		vzorka		ABTS [mmol/l]	
		jačmeň	slad			jačmeň	slad
1	Wikingett	0,080	0,022	11	Marthe	0,112	0,220
2	Troon	0,056	0,091	12	Maltasia	0,088	0,035
3	Cruiser	0,026	0,045	13	Lissane	0,127	0,114
4	Bellevue	0,053	0,236	14	Musikant	0,175	0,114
5	Biatlon	0,136	0,365	15	Xanadu	0,186	0,568
6	Mauritia	0,085	0,083	16	Jersey	0,215	0,652
7	Ebson	0,139	0,114	17	Malvaz	0,056	0,088
8	NFC Tipple	0,103	0,091	18	Binder	0,056	0,017
9	Westminster	0,165	0,053	19	Tepelský	0,023	0,105
10	Publican	0,157	0,518	20	Ratbořský	0,041	0,070



Graf 26 Porovnanie hodnôt celkovej antioxidačnej aktivity v jačmeňoch a v sladoch

U vzoriek s vysokou aktivitou LOX boli namerané aj vyššie hodnoty antioxidačnej aktivity, z čoho vyplýva, že aktivita LOX môže mať súvis s celkovým antioxidačným statusom. V porovnaní vzoriek jačmeňov a sladov je vyššia antioxidačná aktivita u sladov, keďže vplyvom sladovacích procesov dochádza k zvýšeniu obsahu antioxidačných látok v slade. Najvyššie hodnoty TAS boli namerané medzi jačmeňmi u vzoriek 14 (Musikant), 15 (Xanadu) a 16 (Jersey), u sladov to sú vzorky 5 (Biatlon), 10 (Publican), 15 (Xanadu) a 16 (Jersey).

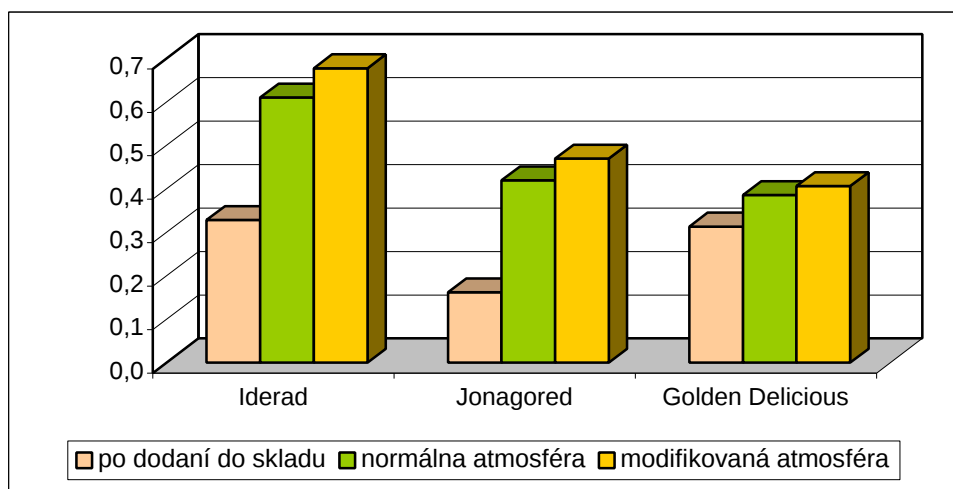
5.2.3.2 Stanovenie celkových polyfenolov

Jablká

Podľa postupu popísaného v kap. 4.5.2 bola prevedená analýza celkových polyfenolov vo vzorkách jabĺk dovezených za čerstva a tiež vo vzorkách uskladnených 158 dní v rôznych druhoch atmosfér. Výsledky sú uvedené v Tab. 63.

Tab. 63 Celkové polyfenoly v jablkách (prepočítané na mg obsahu celkových polyfenolov v grame jedlého podielu jablka)

	celkové polyfenoly [mg/g]		
	po dodaní	po 158 dňoch	
		normálna atmosféra	modifikovaná atmosféra
Idared	0,328	0,610	0,677
Jonagored	0,162	0,419	0,470
Golden Delicious	0,313	0,386	0,222



Graf 27 Porovnanie obsahu polyfenolov v jablkách dodaných za čerstva a po 158 dňoch skladovania

Podobne ako u celkovej antioxidačnej aktivity, aj v prípade analýzy celkových polyfenolov bolo zistené, že na začiatku skladovania, tj. po dodaní vzoriek za čerstva, bol obsah polyfenolov nižší, než po 158 dňoch uskladnenia. Dôvody sú pravdepodobne rovnaké. U plodov dochádza k postupnému dozrievaniu v sklade, alebo pôsobia disimilačné procesy a polyfenoly sú postupne uvoľňované z bunkových štruktúr. Vo všetkých troch stanoveniach boli najvyššie hodnoty namerané u odrody Idared. Zaujímavé je, že po dodaní do skladu boli vyššie hodnoty celkových polyfenolov u odrody Golden Delicious, ale po skladovaní boli hodnoty vyššie u odrody Jonagored. Jablká Golden Delicious boli pravdepodobne dodané v inom stupni zrelosti, než ostatné dve vzorky. Z výsledkov sa dá usúdiť, že z daných typov uskladnenia je najvhodnejšie skladovanie v modifikovanej atmosfére.

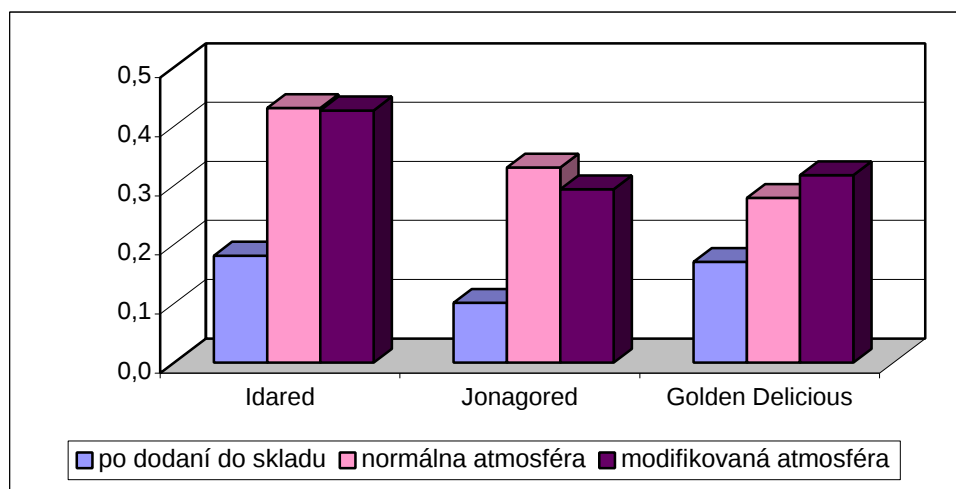
5.2.3.3 Stanovenie celkových flavonoidov

Jablká

Ako časť polyfenolov bol meraný aj obsah flavonoidov podľa postupu v kap. 4.5.3. Výsledky sú uvedené v Tab. 64.

Tab. 64 Celkové flavonoidy v jablkách (prepočítané na mg obsahu celkových polyfenolov v grame jedlého podielu jablka)

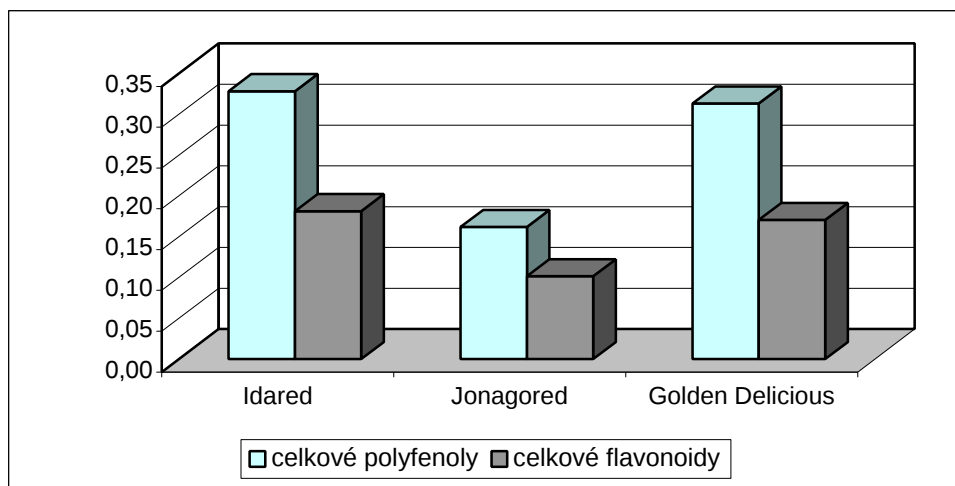
	celkové flavonoidy [mg/g]		
	po dodaní	po 158 dňoch	
		normálna atmosféra	modifikovaná atmosféra
Idared	0,181	0,431	0,427
Jonagored	0,101	0,331	0,294
Golden Delicious	0,171	0,279	0,317



Graf 28 Porovnanie hodnôt celkových flavonoidov vo vzorkách dodaných za čerstva a po 158 dňoch skladovania

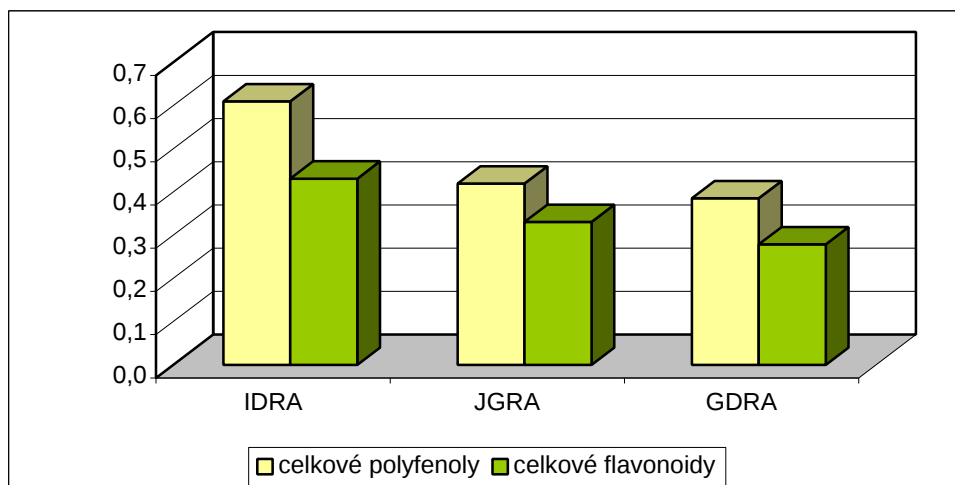
Aj v tomto prípade boli namerané najnižšie obsahy celkových flavonoidov na začiatku skladovania. Najvyššie hodnoty boli zistené opäť u odrody Idared a to vo všetkých typoch merania. Odroda Jonagored má vyšší podiel flavonoidov v normálnej atmosfére než odroda Golden Delicious, naopak je to pri uskladnení v modifikovanej atmosfére. U odrody Idared boli hodnoty celkových flavonoidov u oboch typov skladovania takmer rovnaké. Aj v tomto prípade boli hodnoty flavonoidov na podobnej úrovni ako v literatúre [135].

Po nameraní dát boli vypracované porovnávacie grafy jednotlivých hodnotiacich parametrov.



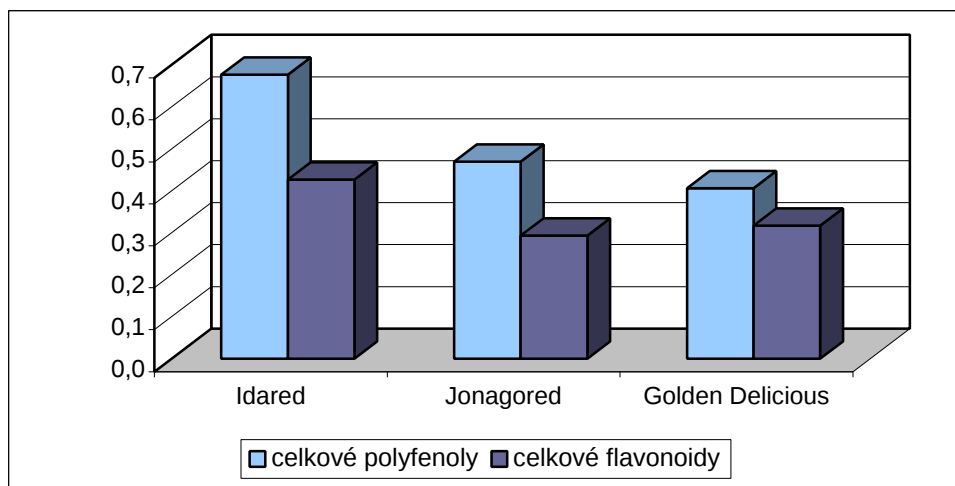
Graf 29 Porovnanie celkového obsahu polyfenolov a celkového obsahu flavonoidov vo vzorkách dodaných za čerstva

Graf 29 uvádza porovnanie celkových polyfenolov a celkových flavonoidov ihneď po zbere, čiže po dodaní do skladu za čerstva. Flavonoidy tvorili približne dve tretiny z celkového obsahu polyfenolov.



Graf 30 Porovnanie celkového obsahu polyfenolov a celkového obsahu flavonoidov vo vzorkách uchovaných 158 dní v normálnej atmosfére

Graf 30 porovnáva pomerný obsah polyfenolov a flavonoidov v jablkách po 158 dňoch uchovania v normálnej atmosfére. Bolo zistené, že u odrôd Idared a Golden Delicious tvorili flavonoidy cca tri štvrtiny z celkového obsahu polyfenolov. U odrody Jonagored to boli približne štyri pätiny.



Graf 31 Porovnanie celkového obsahu polyfenolov a celkového obsahu flavonoidov vo vzorkách uchovaných 158 dní v modifikovanej atmosfére

Graf 31 porovnáva pomer celkových polyfenolov a flavonoidov u jablák skladovaných v modifikovanej atmosfére. Z výsledkov vyplýva, že u odrôd Idared a Jonagored tvorili flavonoidy cca dve tretiny z celkových polyfenolov a u odrody Golden Delicious to boli štyri pätiny.

6 DISKUSIA

Zmena životných podmienok ovplyvňuje každý organizmus. Niektoré zmeny vplyvajú pozitívne, niektoré naopak negatívne. Organizmus má schopnosť adaptovať sa nepriaznivým podmienkam v záujme prežitia, ak sú však pôsobiace podmienky extrémne, tak môže nastať namiesto adaptácie smrť organizmu. V tejto práci je popísaný pozitívny vplyv stresových faktorov na vybrané organizmy – karotogénne kvasinky a vybrané rastlinné materiály. Zmeny vyvolané pôsobením stresových látok je možné zaznamenať na rôznych úrovniach, najčastejšie sa sledujú zmeny proteómu a genómu, avšak do popredia sa tlačí aj pozorovanie zmien metabolómu. Stresová odozva organizmu na nepriaznivé podmienky môže byť rôzna, pozitívna zmena sa prejaví napríklad v nadprodukcii metabolitov, ktoré je možné priemyselne využiť.

Hlavnú časť práce tvorí sledovanie vplyvu osmotického a oxidačného stresu na karotenogénne kmene kvasiniek. Prídavok látok vyvolávajúcich stresovú odozvu mal za cieľ vyvolať nadprodukciu karotenoidov, ktorá by mohla byť priemyselne využiteľná. Na analýzy boli použité kmene kvasiniek z rodov *Rhodotorula* (*Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26 a CCY 20-2-33, *Rhodotorula rubra* (*mucilaginos*) CCY 20-7-28 a CCY 20-7-31, *Rhodotorula aurantiaca* CCY 20-9-7) *Sporobolomyces* (*Sporobolomyces salmonicolor* CCY 19-4-8 a CCY 19-4-6, *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4, *Sporobolomyces shibatanus* CCY 19-20-3) a *Cystofilobasidium* (*Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1 a CCY 10-1-2). Osmotický stres je reprezentovaný prídavkom 2% a 5% NaCl do produkčného média počas kultivácie. Oxidačný stres bol vyvolaný prídavkom 2mM a 5mM H₂O₂, tiež do produkčného média (kap. 4.2.1). Získaná biomasa bola ďalej analyzovaná. Hlavný dôraz bol kladený na analýzu proteómu a metabolómu.

Nevyhnutnou súčasťou experimentov bolo pozorovanie morfológie a rastových vlastností použitých kvasinkových kmeňov za normálnych podmienok, aj po aplikácii stresových faktorov (kap. 5.1.1). Porovnaním buniek bolo zistené, že bunky majú schopnosť sa adaptovať novým životným podmienkam. Tvar buniek u všetkých kmeňov bol po aplikácii stresových látok veľmi podobný kontrolným vzorkám, na ktoré neboli aplikované stresové faktory. U stresovaných buniek dochádza k stenčeniu bunkovej steny. Môžu za to karotenoidy, ktoré sa vo vyššej miere produkujú. Zmeny boli zaznamenané aj pri porovnaní množstva kultivovanej biomasy. U niektorých kmeňov došlo k zvýšenému rastu a tým pádom k zvýšenej produkcii biomasy vplyvom stresových látok, u iných bol zaznamenaný rast porovnateľný s kontrolnou vzorkou. Bunky boli dobre adaptované voči stresu a produkcia biomasy bola porovnateľná s kultiváciou za štandardných podmienok. Za optimálnych podmienok majú všetky použité kmene dvojstupňový charakter rastovej krivky, kde maximum produkcie dominantného pigmentu β -karoténu bolo okolo 80h rastu, približne na začiatku stacionárnej fázy. Z tohto dôvodu boli všetky metabolity izolované z 80h kultivácií.

Hlavnou náplňou práce bolo skúmanie proteómu. Proteíny každého organizmu sú súčasťou dynamického systému. Na zmenách proteómu sa dajú sledovať vplyvy životného prostredia, v ktorom sa organizmus nachádza. Proteóm sa mení, reaguje na vnútorné aj vonkajšie podnety, vplyvajú naň posttranslačné zmeny a iné modifikácie. Každá aj malá zmena životných podmienok sa prejaví na zmene proteínového zloženia. Aplikácia exogénnych stresových

faktorov v živnom médiu vyvoláva zmeny proteómu, ktoré boli pozorované najprv pomocou 1D elektroforéz (kap. 5.1.2) a neskôr aj pomocou 2D elektroforéz (kap.5.1.4) s detekciou vybraných spotov proteínov pomocou MS (kap. 5.1.4). Bola testovaná aj separácia proteínov pomocou mikročipovej elektroforézy (5.1.3). U 1D elektroforéz boli ako prvé prevedené experimenty, ktorými bola prevedená optimalizácia izolačných techník s cieľom nájsť najúčinnějšíu techniku pre získanie dobre viditeľných zón proteínov. Ako porovnávací kmeň bola použitá kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-88. Boli testované rôzne techniky (0,2M NaOH, SDS, sklenené guľôčky, inhibitory proteáz). Z výsledkov vyplýva, že najvhodnejšou formou izolácie proteínov z kvasinkových mikroorganizmov je metóda s použitím NaOH [103] (kap. 4.3.1.2), ktorá sa u všetkých testovaných mikroorganizmov ukázala ako účinnejšia metóda, než s použitím SDS (kap. 4.3.1.3). Najlepšie viditeľné zóny proteínov boli získané u porovnávacieho kmeňa. Je však nutné poznamenať, že *Saccharomyces cerevisiae* má odlišné zloženie bunkovej steny než karotogénne kmene kvasiniek, preto bola izolácia jednoduchšia. Vo všetkých izolačných experimentoch boli aplikované zakaždým obe techniky, aj s NaOH aj s SDS, aby ich bolo možné aj naďalej porovnávať.

Analýza proteínov z karotogénnych kmeňov kvasiniek pomocou 1D elektroforézy u rodu *Rhodotorula* potvrdila zistenia z optimalizácie, keď najvhodnejší izolačný postup bol s použitím NaOH v kombinácii so sklenenými guľôčkami. U všetkých kmeňov boli získané podobné proteínové profily s majoritnými zónami proteínov v rovnakej oblasti molekulovej hmotnosti. Hlavné proteínové frakcie majú molekulové hmotnosti okolo 67 kDa, 45 kDa, 35 - 29 kDa, 24 kDa, 18 kDa, 15 kDa a 10 kDa. Je to aj tým, že u rodu *Rhodotorula* je pravdepodobne stavba bunkových štruktúr na podobnej úrovni a moc sa nelíši.

Proteíny rodu *Sporobolomyces* boli izolované rovnakou technikou ako proteíny rodu *Rhodotorula*. U týchto buniek sa ukázalo, že môžu byť použité oba hlavné izolačné postupy – aj s použitím NaOH, aj s SDS. Výnimku tvorí len kmeň *Sporobolomyces shibatanus*, ktorá má skôr vlastnosti podobné kmeňom rodu *Rhodotorula*. Je možné predpokladať, že zloženie povrchových štruktúr u kvasiniek *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces salmonicolor* je odlišné a menej komplexné, než u ostatných doteraz študovaných kmeňov. Rod *Sporobolomyces* má dominantné zóny proteínov o molekulovej hmotnosti cca 85 kDa, 60 kDa, 48 kDa, 35 kDa, 32 kDa, 24 kDa, 15 kDa a 10 kDa.

U kmeňa *Cystofilobasidium capitatum* bola analýza proteómu prevedená z časových dôvodov len 1x a len u kontrolnej vzorky, pretože stresované bunky neboli k dispozícii. K izolácii boli použité rovnaké metódy ako u ostatných buniek, tj izolácia s použitím NaOH a SDS a navyše bola otestovaná metóda izolácie pomocou TCA (kap. 4.3.1.4). Separácia izolovaných proteínov však nebola tak presvedčivá ako u ostatných kmeňov.

Analýza proteínov pomocou mikročipovej elektroforézy bola snahou zachytiť aktuálny trend minimalizácie procesov v analytických metódach. Cieľom tiež bolo nájsť dobrú a rýchlu porovnávaciu metódu k zdĺhavej 1D elektroforéze. Pre analýzu bol vybraný jeden kmeň z rodu *Rhodotorula* (*Rhodotorula aurantiaca*) a jeden kmeň z rodu *Sporobolomyces* (*Sporobolomyces shibatanus*). Po analýze sa však ukázalo, že separačná účinnosť na takto komplexné vzorky je nedostatočná, a preto pre ďalšie analýzy proteínov z kvasiniek nebola používaná.

Jednoznačné rozdiely v proteínovom zložení po aplikácii stresových faktorov je možné zistiť najmä pomocou 2D elektroforézy. Táto metóda je v súčasnosti najpoužívanejšou separačnou

technikou. Proteíny sa delia na základe ich izoelektrických bodov pomocou izoelektrickej fokusácie a následne podľa molekulovej hmotnosti PAGE-SDS elektroforézou [4, 136]. Pre analýzu komplexných vzoriek kvasinkového proteómu boli vybrané dva kmene karotogénnych kvasiniek – *Rhodotorula glutinis* a *Rhodotorula rubra*. *R. glutinis* bola vybraná ako hlavný modelový organizmus s cieľom sledovať zmeny metabolizmu po aplikácii stresových faktorov na proteínovom zložení, *R. rubra* bola vybraná pre zistenie rozdielov proteínového zloženia kvasinky rovnakého rodu, ale odlišného druhu. Celá analýza vrátane následnej identifikácie bola prevedená v spolupráci s Laboratóriom funkčnej genetiky a proteomiky PĽF MÚ v Brne. Separáciou zmesi proteínov boli získané zóny proteínov, z ktorých časť bola analyzovaná pomocou hmotnostnej spektrometrie. Problémom je však doteraz nesekvenovaný genóm červených kvasiniek, preto identifikácia pozostáva z porovnávania s proteínmi v databázach už sekvenovaných kmeňov kvasiniek, ako napr. *S. cerevisiae*.

U kvasinky *R. glutinis* boli pomocou 2D elektroforézy a následnej MS analýzy zistené jasné rozdiely v proteínovom zložení medzi jednotlivými druhmi stresov a kontrolou. Najväčšie zmeny boli pozorované u oxidačných stresov (2mM H₂O₂), kde bolo podexprimovaných 247 spotov z 310 vyhodnocovaných. 116 proteínov malo zníženú expresiu o jeden rád, 2 až o dva rády. Zvýšenú expresiu vykázalo 63 proteínov, z nich 38 bolo exprimovaných o 1 rád a 7 dokonca o 2 rády. Vyrovnaná stresová odozva bola zaznamenaná u 2% NaCl, pričom adaptácia kvasinky na tieto stresové podmienky vplývala pozitívne aj na produkciu karotenoidov. Pri zvýšení koncentrácie soľného stresu (5% NaCl) došlo k podexpresii u ďalších 67 spotov bielkovín oproti 2% NaCl. U oboch stresových faktorov boli nájdené skupiny proteínov, ktoré vykazujú zmeny expresie podobného typu. Výraznejšie zmeny expresie vykazovali najmä enzýmy zahrnuté v primárnych metabolických dráhach kvasinky, ako je citrátový cyklus, glykolýza, proteosyntéza a stresová odozva.

U kvasinky *R. rubra* boli najväčšie zmeny pozorované u soľných stresov, kde pri 2% NaCl bolo podexprimovaných 89 spotov a u 5% NaCl 83 spotov proteínov. Nadexprimovaných bolo 45 spotov u 2% NaCl a 38 spotov u 5% NaCl. U oxidačných stresov bola zaznamenaná lepšia adaptačná schopnosť než u soľných stresov. Hoci bolo u oboch typov stresov viac podexprimovaných spotov (57 u 2mM H₂O₂, 65 u 5mM H₂O₂), počet nadexprimovaných bol na podobnej úrovni (33 u 2mM H₂O₂ a 45 u 5mM H₂O₂). V proteomickej analýze kvasinky *R. rubra* bolo detekovaných menej proteínov a zmeny v zložení proteómu nie sú tak viditeľné ako u *R. glutinis*. Pri náraste koncentrácie stresových faktorov dochádza aj k zmenám proteómu, obvykle v tom istom smere. U oboch kvasiniek bolo nájdených cca 5 skupín proteínov, ktoré vykazujú podobné zmeny počas vplyvu stresových faktorov. Najčastejšie sa jedná o proteíny skupiny HSP.

Identifikácia jednotlivých proteínov u oboch analyzovaných kmeňov rodu *Rhodotorula* ukázala podobné zmeny expresie vyvolanej stresom, či už išlo o zmeny proteínov zapojených v proteosyntéze (napr. elongačné faktory, ribozomálne proteíny), v primárnom metabolizme (napr. ICDH, ATP-syntháza, ATP-ADP mitochondriálny transportný systém) i v samotnej stresovej odozve (napr. HSP70, HSP90; ubiquitín-aktivačný enzým, thioredoxín peroxidáza a ďalšie). Zvýšená expresia bola pozorovaná u niektorých metabolických enzýmov hlavných dráh primárneho metabolizmu: enzýmy Krebsovho cyklu (ICDH, akonitáza, 2-oxoglutarát-dehydrogenáza); beta-oxidácia mastných kyselín (dehydrogenáza hydroxy-kyselín), metabolizmu aminokyselín i faktorov zapojených v proteosyntéze. Nadexprimované boli tiež samotné stresové

proteíny (HSP70, HSP 90; HSS1, thioredoxín-peroxidáza) a proteíny zapojené v regulácii obratu proteínov (ubiquitín-aktivujúci enzým). Naopak významne znížená expresia bola zaznamenaná u enzýmov glykolýzy (glyceraldehyd-3P-dehydrogenáza), syntézy mastných kyselín (dehydratáza MK) a tiež u niektorých stresových a regulačných proteínov (napr. beta-podjednotka G-proteínu a niektoré HSP). Vybrané skupiny proteínov, ktoré boli identifikované, budú detailne analyzované na molekulovej úrovni v naväzujúcich prácach k tejto téme.

Ďalšou časťou práce bolo sledovanie produkcie karotenoidov v kvasinkových mikroorganizmoch. Aplikáciou stresových látok je možné zmeniť metabolizmus natoľko, že je možné dosiahnuť nadprodukcii vybraných metabolitov (napríklad β -karoténu) [115], čo je priemyselne využiteľné. Analýzy boli prevedené na kvasinkách rodov *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* a *Cystofilobasidium*. Karotenoidy (β -karotén, lykopén) boli izolované viacstupňovou extrakciou organickými rozpúšťadlami (kap. 4.5.1). Ich analýza bola prevedená pomocou HPLC so spektrofotometrickou detekciou (kap. 4.5.5). Identifikácia jednotlivých pigmentov bola verifikovaná aj pomocou on-line LC-MS [115].

Kvasinka *R. glutinis* ako hlavný modelový organizmus preukázala zvýšenú produkciu sledovaných metabolitov. Najmä aplikácia 2% NaCl do živného média spôsobila takmer dvojnásobný nárast (404,55 $\mu\text{g/g}$) v obsahu β -karoténu oproti kontrolnej vzorke (207,52 $\mu\text{g/g}$). Zvýšená produkcia bola zaznamenaná aj u 5% NaCl, takže táto forma osmotického stresu sa ukázala jako vhodný stimulans. Naopak pri aplikácii oxidačného stresu (2mM a 5mM H_2O_2) bol zistený vyšší obsah lykopénu, čo znamená, že nedošlo ešte k úplnej konverzii na β -karotén. U kvasinky *R. rubra* bola zistená odolnosť voči vplyvu stresových faktorov, takže produkcia karotenoidov nebola dostatočná a pravdepodobne tento kmeň nie je vhodný na priemyselné využitie. Celkovo je možné zhodnotiť, že aplikácia nižších koncentrácií stresových faktorov ovplyvňuje pozitívne produkciu karotenoidov a tú je možné aj priemyselne využiť, pričom nie sú potrebné vysoké náklady.

Kvasinky rodu *Sporobolomyces* preukázali nižšiu schopnosť produkcie karotenoidov, než kvasinky rodu *Rhodotorula*. Tiež bolo zistené, že citlivejšie reagujú na aplikované stresové faktory, takže prípadné priemyselné využitie bude založené na návrhu „na mieru“ pre každú kvasinku zvlášť. Toto platí aj pre rod *Rhodotorula*. Vhodným stresovým faktorom je možné dosiahnuť vyššiu produkciu vybraných metabolitov, je ale potrebné myslieť na metabolizmus kvasinky a jej prirodzené životné prostredie, pretože z toho sa dajú odvodiť adaptačné mechanizmy, ktoré boli aplikáciou stresu aktivované.

Druhú časť práce tvorí aplikácia metód analýzy proteínov na rastlinné vzorky – ovocné plody a cereálie. Aj v tomto prípade bola skúmaná stresová odozva organizmov. Vzorky ovocia – konkrétne jablák boli vystavené exogénnemu stresu vo forme dlhodobého uchovávaní v atmosfére s regulovaným obsahom kyslíka. V cereáliách – konkrétne v jačmeni, bol sledovaný enzým lipoxygenáza, ktorý je zapojený v oxidačno-redukčnej rovnováhe a ktorého hladina v rastline ovplyvňuje kvalitu jačmeňa počas dlhodobého skladovania. Hlavná pozornosť práce bola venovaná najmä optimalizácii metód pre stanovenie aktivity antioxidačných enzýmov a interpretácii dát, ktoré sú zapojené v stresovej odozve rastlinných organizmov.

Na vzorky z jablák odrôd Idared, Jonagored a Golden Delicious boli najprv aplikované štandardné metódy určenia celkového obsahu proteínov (Hartree-Lowryho metóda). Po potvrdení nízkeho obsahu proteínov [125] bola prevedená aj 1D elektroforéza a mikročipová elektroforéza

izolovaných proteínov. Cieľom bolo potvrdenie predpokladaného obsahu antioxidantných enzýmov superoxiddismutáza, kataláza a polyfenoloxidáza aspoň na základe molekulovej hmotnosti. K presnejšej identifikácii bola využitá metóda Western Blot, ktorou bol potvrdený obsah enzýmu superoxiddismutáza.

Enzýmovou analýzou boli u vzoriek jabĺk stanovené aktivity enzýmov superoxiddismutáza, kataláza a polyfenoloxidáza. Vzorky boli uchované v normálnej aj modifikovanej atmosfére. Najvyššia aktivita enzýmu SOD bola zaznamenaná u odrody Idared uchovávanej v modifikovanej atmosfére. Potvrďuje to teóriu, že modifikovaná atmosféra je vhodná na uchovanie čo najväčšieho množstva antioxidantných látok. Pri porovnaní aktivít SOD u jabĺk uchovávaných v normálnej atmosfére vykazovala najlepšie výsledky odroda Jonagored, za ktorou bola odroda Idared. Najmenšiu aktivitu v oboch typoch atmosfér vykázala odroda Golden Delicious, z čoho možno usudzovať, že zelenej odrode je menšie zastúpenie SOD než u červených odrôd. Enzým CAT mal vyššiu aktivitu vo vzorkách uchovávaných v normálnej atmosfére. Dá sa z toho odvodiť, že jablká uchovávané v normálnej atmosfére majú viac aktivované antioxidantné systémy, než jablká, ktoré boli uchovávané v modifikovanej atmosfére. Najvyššia aktivita enzýmu PPO bola nameraná vo vzorke Idared uchovanej v normálnej atmosfére. Najmenšia u zelenej odrody Golden Delicious. U červených odrôd bol zaznamenaný skôr negatívny vplyv modifikovanej atmosféry na aktivitu PPO. Dôvodom môže byť zvýšená mobilizácia obranných enzýmových systémov v červených odrodách jabĺk vo fáze postupnej degradácie plodov. Použité červené odrody majú totiž kratšiu dobu uchovateľnosti, než zelená odroda.

Enzým lipoxygénáza bol sledovaný v 20 vzorkách sladovníckeho jačmeňa (dodané z VÚPS), a následne aj v slade. Z technologického hľadiska ovplyvňuje výskyt LOX senzorickú kvalitu piva, keďže sa enzým ťažko inaktivuje a jeho aktivita je vysoká aj pri nízkych teplotách [129]. Enzým poškodzuje už uskladnený jačmeň. Jeho zhoršená kvalita po pôsobení lipoxygénázy sa prejavuje škraľavou a horkou chuťou [130]. V jačmeni sa vyskytuje len jedna forma lipoxygénázy, a to LOX-1, LOX-2 sa objavuje až v priebehu klíčenia. Kvantitatívne sa nachádza v zelenom slade 80% LOX-1 a 20% LOX-2 [131]. V experimente boli sledované zmeny enzýmovej aktivity jednotlivých jačmeňov a sladov v čase - ihneď po dodaní vzorky a jej spracovaní, po 1 mesiaci a po 3 mesiacoch. Najvyššie aktivity LOX-1 u vzoriek jačmeňa boli zaznamenané vo vzorkách hneď po dodaní. Aktivita LOX-1 v slade bola 2 – 3x vyššia než vo vzorkách jačmeňa. Jačmeň a slad môžu obsahovať látky, ktoré majú inhibičný efekt na pôsobenie LOX [133]. Tento inhibičný efekt bol testovaný, pričom inhibičná aktivita extraktov sladu bola 2 – 3x vyššia než inhibičná aktivita u extraktov jačmeňov. Vo väčšine vzoriek s vyššou aktivitou LOX bol zaznamenaný tiež vysoký inhibičný efekt voči štandardnému prídatku LOX.

Kvôli výskytu antioxidantných látok boli rastlinné vzorky testované na celkovú antioxidantnú aktivitu. U jabĺk bola najnižšia celková antioxidantná aktivita nameraná po dodaní jabĺk za čerstva. Príčinou môže byť nedostatočná zrelosť počas zberu. Vyššie hodnoty boli namerané u jabĺk, ktoré boli uchovávané v atmosférach. U týchto vzoriek boli hodnoty TAS oveľa vyššie, keďže jablká dozreli až v sklade. Ďalším vplyvom môžu byť disimilačné procesy a vyplavovanie v bunke viazaných látok pod ich vplyvom. Vo všetkých troch odrodách bola najvyššia aktivita zaznamenaná u vzoriek uchovaných v modifikovanej atmosfére, úplne najviac u odrody Idared. U jačmeňov boli zistené vysoké hodnoty antioxidantnej aktivity u vzoriek s vysokou aktivitou

LOX, z čoho vyplýva, že aktivita LOX môže mať súvis s celkovým antioxidačným statusom. V porovnaní vzoriek jačmeňov a sladu je vyššia antioxidačná aktivita u sladov, keďže vplyvom sladovacích procesov dochádza k zvýšeniu obsahu antioxidačných látok v slade.

U vzoriek jablák boli z antioxidačných látok stanovené aj celkové polyfenoly a celkové flavonoidy. Podobne ako u celkovej antioxidačnej aktivity, aj v prípade analýzy celkových polyfenolov sa zistilo, že na začiatku skladovania, tj. po dodaní vzoriek za čerstva, bol obsah polyfenolov nižší, než po 158 dňoch uskladnenia. Dôvody sú pravdepodobne rovnaké. U plodov dochádza k postupnému dozrievaniu v sklade, alebo pôsobia disimilačné procesy a polyfenoly sú postupne uvoľňované z bunkových štruktúr. Vo všetkých troch stanoveniach boli najvyššie hodnoty namerané u odrody Idared. Z výsledkov sa dá usúdiť, že z daných typov uskladnenia je najvhodnejšie skladovanie v modifikovanej atmosfére. Z literatúry tiež vyplýva, že obsah polyfenolov počas dlhodobého skladovania stúpa [134]. V porovnaní s ďalšou literatúrou [135] boli hodnoty polyfenolov v jablkách na podobnej úrovni. U celkových flavonoidov boli výsledky veľmi podobné.

7 ZÁVERY

- Predložená práca sa dá rozdeliť na dve hlavné časti. Prvú tvorí testovanie vplyvu exogénnych faktorov na kvasinkové mikroorganizmy, s dôrazom kladeným na sledovanie zmien proteómu a metabolómu so zameraním na vypracovanie metodiky analýzy proteínov. Druhú tvorí analýza proteínov a antioxidačných látok v rastlinných vzorkách, pričom tiež boli zavedené nové metodiky pre enzýmovú analýzu.
- V rámci prvej časti bolo testovaných sedem aeróbných kmeňov karotenogénnych kvasiniek (*Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces shibatanus* a *Cystofilobasidium capitatum*). Kultivácia prebehla za optimálnych podmienok a k tomu boli na všetky kmene aplikované exogénne stresové faktory vo forme prídavku NaCl (2% a 5% NaCl) a H₂O₂ (2mM a 5mM H₂O₂) do produkčného média.
- Kvasinky za optimálnych podmienok vykazujú dvojstupňový charakter rastovej krivky, kde maximum produkcie pre majoritný pigment β -karotén je okolo 80h na začiatku predĺženej stacionárnej fázy. Preto všetky metabolity (karotenoidy aj proteíny) boli izolované z 80h kultivácií.
- V rámci optimalizácií boli testované rôzne metódy izolácie proteínov pre separáciu 1D PAGE-SDS elektroforézou. Ako porovnávací kmeň použitá kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, popri ktorej bol na prvotné analýzy použitý aj kmeň *S. salmonicolor* ako zástupca rodu *Sporobolomyces* a *R. glutinis* ako zástupca rodu *Rhodotorula*. Testovaný bol aj vplyv prídavku inhibítorov proteáz, či vplyv lyofilizácie buniek na neskoršiu izoláciu proteínov. Za najvhodnejšiu metódu izolácie bola určená metóda s použitím 0,2M NaOH spoločne s mechanickou dezintegráciou sklenenými guľôčkami. Pre porovnanie však bola používaná aj metóda s 10% SDS.
- Po optimalizácii boli izolované proteíny zo všetkých kmeňov. Okrem buniek kultivovaných za optimálnych podmienok boli proteíny izolované aj z buniek, na ktoré boli aplikované exogénne stresové faktory. Cieľom bolo porovnať proteínové profily kontrolných vzoriek a stresovaných vzoriek.
- Izolované proteíny boli separované pomocou 1D PAGE-SDS na 10% a 12,5% géloch. Vizualizácia bola prevedená pomocou Coomassie Brilliant Blue a pomocou farbenia striebrom, ktoré je citlivejšie a je schopné detekovať aj malé množstvá proteínov. Zóny separovaných proteínov boli porovnávané s proteínovými štandardami. V mnohých prípadoch boli získané jasne viditeľné zóny proteínov, kde bola určená orientačná molekulová hmotnosť na základe proteínových štandardov. Na presnejšiu identifikáciu proteínov však bola aplikovaná 2D elektroforéza, aj keď len u vybraných kmeňov.

- V rámci testovania bola použitá na separovanie proteínov aj mikročipová elektroforéza, ktorá bola aplikovaná na jeden kmeň z rodu *Rhodotorula* (*R. aurantiaca*) a jeden kmeň z rodu *Sporobolomyces* (*S. shibatanus*). Aj v tomto prípade boli separované proteíny z kontrolnej vzorky aj zo stresovaných buniek. Táto analýza však nepreukázala dostatočnú separačnú účinnosť a potvrdila využitie mikročipovej elektroforézy len pre vzorky menej komplexného charakteru.
- 2D elektroforéza bola aplikovaná na proteíny izolované z kvasiniek *R. glutinis* a *R. rubra*. Pre izoláciu proteínov boli použité lyofilizované bunky. Po izoelektrickej fokusácii a PAGE-SDS boli gély farbené buď striebrom alebo farbivom Sypro Ruby. Získané proteínové profily ukázali rozdiely v proteomickom zložení medzi kontrolnými a stresovanými vzorkami. Vyrovnaná stresová odozva bola zaznamenaná u kvasinky *R. glutinis* pri 2% NaCl strese, kde bol pomer nadexpresie a podexpresie proteínov relatívne vyrovnaný. Dobrá adaptácia kvasinky tomuto druhu stresu sa ukázala aj pri produkcii karotenoidov. U peroxidových stresov bolo u *R. glutinis* väčšie množstvo proteínov podexprimovaných. U kvasinky *R. rubra* nebolo toľko zmien v proteóme ako u *R. glutinis* a celkovo bolo detekovaných menej proteínov.
- Časť práce tvorila aj snaha identifikovať u študovaných kvasiniek jednotlivé proteíny, u ktorých došlo vplyvom stresu k významnej zmene expresie. V rámci opakovaných experimentov sa podarilo identifikovať približne 25% zo spotov, u ktorých došlo k významnej zmene expresie (najmenej 3x vyššia alebo nižšia intenzita spotu). Identifikované proteíny boli lokalizované vo všetkých častiach bunky.
- U oboch analyzovaných kmeňov rodu *Rhodotorula* boli pozorované niektoré podobné zmeny expresie vyvolané stresom, či už išlo o zmeny proteínov zapojených v proteosyntéze (napr. elongačné faktory, ribozomálne proteíny), v primárnom metabolizme (ICDH, ATP-syntháza, ATP-ADP mitochondriálny transportný systém) i v samotnej stresovej odozve (napr. HSP70, HSP90; ubiquitín-aktivačný enzým, thioredoxín peroxidáza a ďalšie). Zvýšená expresia bola pozorovaná u niektorých metabolických enzýmov hlavných dráh primárneho metabolizmu: enzýmy Krebsovho cyklu (ICDH, akonitáza, 2-oxoglutarát-dehydrogenáza); beta-oxidácia mastných kyselín (dehydrogenáza hydroxy-kyselín), metabolizmu aminokyselín i faktorov zapojených v proteosyntéze. Nadexprimované boli tiež samotné stresové proteíny (HSP70, HSP 90; HSS1, thioredoxín-peroxidáza) a proteíny zapojené v regulácii obratu proteínov (ubiquitín-aktivujúci enzým). Naopak významne znížená expresia bola zaznamenaná u enzýmov glykolýzy (glyceraldehyd-3P-dehydrogenáza), syntézy mastných kyselín (dehydratáza MK) a tiež u niektorých stresových a regulačných proteínov (napr. beta-podjednotka G-proteínu a niektoré HSP).
- Súčasťou experimentov bolo tiež sledovanie zmien produkcie karotenoidov u všetkých kmeňov, na ktoré boli aplikované exogénne stresové faktory. Stres bol vyvolaný prídavkom chemických stresových faktorov - 2% NaCl, 5% NaCl, 2mM H₂O₂ a 5mM H₂O₂ do produkčného média. Ich účinok bol sledovaný na produkcii β-karoténu a luteínu.

Ako najvhodnejší producent sa ukázala kvasinka *R. glutinis*, ktorá v kombinácii najmä s 2% NaCl stresom mala optimálny pomer nárastu biomasy, obsahu karotenoidov a tiež proteomická analýza ukázala v tomto prípade dobrú schopnosť adaptácie. Ďalšiu možnosť dobrého pomeru produkcie karotenoidov a adaptácie kvasinky na nové podmienky poskytuje kvasinka *R. glutinis* spoločne s 5% NaCl stresom. Zaujímavé hodnoty boli namerané u kvasinky *S. salmonicolor*, kde napriek nízkemu nárastu biomasy bol zistený vysoký obsah β -karoténu u všetkých stresovaných buniek oproti kontrole.

- V druhej časti práce bol sledovaný vplyv rozdielnych skladovacích podmienok u troch odrôd jablák na aktivitu antioxidantných enzýmov (superoxiddismutáza, kataláza, polyfenoloxidáza), antioxidantných látok (celkové polyfenoly, celkové flavonoidy) a celkovú antioxidantnú aktivitu. Pred enzýmovými analýzami boli prevedené základné metódy určenia obsahu celkových proteínov. Hartree-Lowryho metóda potvrdila tabuľkový obsah proteínov vo vzorkách jablák. Pomocou mikročipovej elektroforézy a 1D elektroforézy boli na základe molekulovej hmotnosti orientačne určené majoritné proteíny z jablák. Potvrdenie enzýmu superoxiddismutázy prebehlo aj pomocou metódy Western Blot.
- Pre analýzu enzýmových aktivít bola kompletne zavedená nová metodika analýz. Vo vzorkách uchovávaných v normálnej atmosfére bola najvyššia aktivita zaznamenaná vo všetkých troch odrodách u enzýmu kataláza, ako druhý v poradí je enzým superoxiddismutáza a najmenšiu aktivitu vykazovala polyfenoloxidáza. V odrodovom zastúpení vykazovala najvyššiu enzýmovú aktivitu odroda Idared, kde boli namerané najvyššie hodnoty u CAT a PPO. Podobné výsledky boli namerané aj u jablák uchovávaných v modifikovanej atmosfére. Na aktivitu antioxidantných enzýmov má okrem odrodových vlastností vplyv aj stupeň zrelosti plodu počas zberu a prítomnosť nízkomolekulových antioxidantov.
- Celková antioxidantná aktivita bola u všetkých odrôd jablák najnižšia vo vzorkách hneď po zbere, skladovaním stúpala. Rovnakú tendenciu vykázali aj obsahy celkových polyfenolov a celkových flavonoidov. Merania potvrdili spúšťanie antioxidantných mechanizmov po zbere pre dosiahnutie zachovania maximálneho obsahu živín a trvanlivosti jablák.
- U vzoriek jačmeňov a sladov bola sledovaná enzýmová aktivita enzýmu lipoxigenáza, ktorý má vplyv na senzorické vlastnosti piva. Bolo zistené, že najvyššia aktivita enzýmu u vzoriek jačmeňov bola hneď po dodaní vzoriek, so skladovaním aktivita rapídne klesala. Tiež bol zisťovaný inhibičný efekt jačmeňov a sladov na štandardný prídavok lipoxigenázy. Inhibičný efekt sladov bol 2 – 3x väčší než u jačmeňov, čo zapríčiňujú prirodzené procesy sladovania. Tiež bola nameraná celková antioxidantná aktivita. U vzoriek, kde bola nameraná vysoká aktivita LOX, bol vysoký aj celkový antioxidantný status.

8 ZOZNAM SKRATIEK

BPB	Brómfenolová modrá
CAT	kataláza
CHAPS	(3-[(3-cholamidopropyl)-dimetylamónio]-propán-sulfonát)
CC	Cystofilobasidium capitatum
DTT	dithiothreitol
DMSO	dimethylsulfoxid
HSP	heat shock proteins
IgG	imunoglobulín G
LOX	lipoxygénáza
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight, Mass Spektrometry
MÚ	Masarykova univerzita
NaOH	hydroxid sodný
PMSF	fenylmethanesulfonyl fluorid
PPO	polyfenoloxidáza
PVDF	polyvinyliden fluorid
RA	Rhodotorula aurantiaca
RG	Rhodotorula glutinis
ROS	reactive oxygen species
RR	Rhodotorula rubra
SAV	Slovenská akadémia vied
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutáza
SR	Sporobolomyces roseus
SS	Sporobolomyces salmonicolor
SSh	Sporobolomyces shibatanus
TAP	tandem affinity purification
TCA	kyselina trichlóroctová
TEV	tobacco etch virus
VÚPS	Výskumný ústav pivovarský a sladársky
YPD	yeast-peptone-dextrose

9 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. KELLNER R., L.F., MEYER H.E. *Microcharacterization of Proteins*. 2nd WILEY-VCH. 1999. 325 s. ISBN 3-527-30084-8.
2. BOUCHAL, P., KUČERA, I. Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: principy a aplikace. *Chemické Listy*, 2003. 97, s. 29 - 36.
3. REINDERS, J. *Proteom.jpg* [online] [cit. 2007-10-27]; Dostupné z: www.proteomics-online.de.
4. WITTMANN-LIEBOLD, B., GRAACK, H.R., and POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*, 2006. 6(17), s. 4688-4703.
5. ALBERTS, B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*, 1998. 92, s. 291-294.
6. BLAGOEV, B., ONG, S. E., KRATCHMAROVA, I., MANN, M. Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nature Biotechnology*, 2004. 22, s. 1139-1145.
7. ROCHFORD, S. Metabolomics Reviewed: A New “Omics” Platform Technology for Systems Biology and Implications for Natural Products Research. *Journal of Natural Products*, 2005. 68(12), s. 1813–1820.
8. WALKER, G.M. *Yeast – Physiology and Biotechnology*, Chicester: John Wiley & Sons Ltd. 1998.
9. ATTFIELD, P.V. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, 1997. 15(13), s. 1351-1357.
10. TROTT, A., MORANO, K.A. *Topics in Current Genetics: Yeast Stress Responses*, ed. Hohmann, S., Mager, P.W.H. Vol. 1, Berlin: Springer-Verlag. 2003.
11. SÓTI, C., CSERMELY, P. Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease. *Journal of Biosciences*, 2007. 32(3), s. 511–515.
12. NESATYY, V.J. and SUTER, M.J.F. Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms. *Environmental Science & Technology*, 2007. 41(20), s. 6891-6900.
13. ZHAO, B., et al. Proteome analysis of heat shock protein expression in *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867 in response to gentisate exposure and elevated growth temperature. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007. 97(3), s. 506-514.
14. MAGER, W.H., MORADAS FERREIRA, P. Stress response of yeast. *Biochemical Journal*, 1993. 290, s. 1-13.
15. ANDREISHCHEVA, E.N., ZVYAGILSKAYA, R.A. Adaptation of yeasts to salt stress. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1999. 35(3), s. 217 – 228.
16. MERCK. *Oxidative stress. Technical overview*. [cit. 2009-08-13]; Dostupné z: http://www.merckbiosciences.co.uk/html/cbc/oxidative_stress_text.htm#cont.
17. HERRERO, E., ROS, J., BELLÍ, G., CABISCOL, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008. 1780, s. 1217-1235.
18. IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 1996. 320, s. 61-67.

19. ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Praha: Victoria Publishing. 1995. 978-80-200-17.
20. KOCKOVÁ – KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*, Bratislava: Alfa 1990. ISBN 80-05-00644-6.
21. VOETA, D., VOETOVÁ, J.: *Biochemie*, Praha: Victoria Publishing. 1990. 80-85605-44-9.
22. KURTZMAN, C.P. *Yeasts: A Taxonomic Study*. 5th edition: Elsevier Science Ltd. 2009. ISBN 9780444521491.
23. AKSU, Z. and EREN, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 2005. 40(9), s. 2985-2991.1359-5113.
24. SAMPAIO, J.P., GADANHO, M. BAUER, R. Taxonomic studies on the genus *Cystofilobasidium*: description of *C. ferigula* sp. nov. and clarification of the status of *C. lari-marini*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 2001. 51, s. 221-229.
25. ABASSI, N.A., KUSHAD, M. M., ENDRESS, A. G. . Active oxygen-scavenging enzymes activities in developing apple flowers and fruits. *In Scientia Horticulturae*, 1998, s. 183-194.
26. KISELEV, N., SHPITZBERG, C., VAINSHTEIN, B.: Crystallization of Catalase in the Form of Tubes with Monomolecular Walls *Journal of Molecular Biology*, 1967. 25(433)
27. ALTOMARE, R., KOHLER, J., GREENFIELD, P., KITTRELL, J. Deactivation of Immobilized Beef Liver Catalase by Hydrogen Peroxide. *Biotechnol Bioeng*, 1974. 16(1659)
28. SAKAMOTO, T., HIGASHI, T. Studies on Rat Liver Catalase. VIII. Isolation and Translation of Catalase Messenger RNA *Journal of Biological Chemistry (Tokyo)*, 1974. 76(1227)
29. PEETERS-JORIS, C., VANDEVOORDE, A., BAUDHUIN, P. Subcellular Localization of Superoxide Dismutase in Rat Liver. *Biochemical Journal*, 1975. 150(31)
30. VILLAFRANCA, J., YOST, F., FRIDOVICH, I. Magnetic Resonance Studies of Manganese (III) and Iron (III) Superoxide Dismutases. *Journal of Biological Chemistry*, 1974. 249(3532)
31. TILLY, J.L., TILLY, K.I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*, 1995. 136, s. 242-252
32. KEELE, B.B.M., J.M.; FRIDOVICH, I. Further characterization of bovine superoxide dismutase and its isolation from bovine heart. *Journal of Biological Chemistry*, 1971. 246, s. 2875-2880
33. CASS, A.E.G. *Superoxide dismutases*, in *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids* Berthon, G., Editor. 1995. s. 372-387.
34. MATSUDA, Y.H., S.; KIJIMA, Y.; SUZUKI, K.; KAWANO, K.; AKIYAMA, M.; KAWATA, S.; TARUI, S.; DEUTSCH, H.F.; TANIGUCHI, N. Human liver manganese superoxide dismutase. Purification and crystallization, subunit association and sulfhydryl reactivity. *European Journal of Biochemistry*, 1990. 194, s. 713-720
35. HAVLOVÁ, P. Hydrolytic and oxidoreduction enzymes of barley malt. 1999(1)

36. NAG, P., PAUL, A.K., MUKHERJI, S. Toxic Action of Zinc on Growth and Enzyme Activities of Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings. *Environmental Pollution (Series A)*, 1984. 36(1), s. 45-59.
37. SARKAR, R.K., BANERJEE, A., MUKHERJI, S. . Acceleration of peroxidase and catalase activities in leaves of wild dicotyledonous plants, as an indication of automobile exhaust pollution. *Environmental pollution. Series A. Ecological and biological*, 1986. 42(4), s. 289-295.
38. RAMASWAMY, H., MARCOTTE, M. *Food Processing. Principles and Applications.*: Taylor & Francis Group 2005. ISBN 1587160080.
39. DUCKWORTH, H., COLEMAN, J. Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase *Journal of Biological Chemistry*, 1970. 245(1613)
40. JOLLEY, R., EVANS, L., MAKINO, N., MASON, H. Oxytyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1974. 249(335)
41. AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M., LAAKSO, S. Lipoxygenase from Soybeans. *Methods in Enzymology*, 1981. 71(53), s. 441-451.
42. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*, Tábor: Osis. 1999.
43. AUSICH, R.L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. *Pure and Applied Chemistry*, 1997. 69, s. 2169-2173.
44. EDGE, R., MCGARVEY, D.J., TRUSCOTT, T.G. The carotenoids as antioxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 1997. 41, s. 189-200.
45. CHEMLER. *Microbial Cell Factories*. Vol. 5. 2006. 1475-2859-5-20.
46. BRONZETTI, G. Antimutagens in food. *Trends in Food Science & Technology*, 1994. 5(12), s. 390 – 395.
47. SCITA, G. Stability of β -carotene under different laboratory conditions. *Methods in Enzymology*, 1992. 213, s. 175-185.
48. ROEDING-PENMAN, A., GORDON, M. H. . Antioxidants properties of catechins and green tea extracts in model food emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. 45, s. 4267-4270.
49. KURODA, Y. Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research*, 1996. 361, s. 179-186.
50. CHEN, H., ZUO, Y., DENG, Y. . Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 2001. 913, s. 387-395.
51. BLOCK, G. A role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutrition Reviews*, 1992. 50
52. SAVOV, V., KUJUMDZIEVA, A., RASHEVA, T. *Disintegration of Microbial Cells*. 2001. ISBN 954-785-002-4.
53. WALSH, G. *Proteins: biochemistry and biotechnology*: Wiley. 2001. ISBN: 978-0-471-89907-5.
54. JAENICKE, R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *European Journal of Biochemistry*, 1991. 202, s. 715 - 728
55. JANSON, J., RYDÉN, L. *Protein purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*: John Wiley & Sons, Inc., USA. 1998.
56. BIOTECH, A.P. *Protein Purification. Handbook*. 1999.
57. BÍLKOVÁ, K., KRÁLOVÁ, B. *Izolace biomakromolekul*, Praha: Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vydavatelství VŠCHT Praha. 1999. ISBN 80-7080-288-X.
58. TZANNIS, S.T. *Tutorial on Cell Disruption*. 1991, RPI.

59. CENTER, F.B. *Protein Purification*. 2005, Virginia Polytechnic Institute and State University.
60. RIGAUT, G. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, 1999. 17, s. 1030-1032.
61. GAVIN, A.C., ET AL. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 2002. 415
62. PUIG, O., CASPARY, F., RIGAUT, G., RUTZ, B., BOUVERET, E., BRAGADO-NILSSON, E., WILM, M., SE´RAPHIN, B. The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *METHODS*, 2001. 24, s. 218–229.
63. KOLKMAN, A., SLIJPER, M., HECK, A.J.R. . Development and application of proteomics technologies in *Saccharomyces cerevisiae*. *TRENDS in Biotechnology*, 2005. 23(12), s. 598-604.
64. STOSCHECK, C.M. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 1990. 182, s. 50-69
65. BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976. 72, s. 248-254.
66. POPPE, L., NOVAK, L. (1992) *Selective Biocatalysis. A synthetic approach.*,
67. VODRÁŽKA, Z., RAUCH, P., KÁŠ, J. *Enzymologie*. 2001, VŠCHT: Praha.
68. JAKUBOWSKI, H. *Experimental Techniques. Electrophoresis*. 2006 23.04.2006 [cit. 2009-09-09]; Dostupné z: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresis.htm>.
69. *Western Blot*. 2007 17.7.2007 [cit. 2009-09-09]; Dostupné z: <http://www.drobkysveta.estranky.cz/clanky/chemie/western-blot>.
70. KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy - výkladový slovník*. Vol. 1.vydání, Praha: VŠCHT Praha. 2004. ISBN 80-7080-551-X.
71. BERKELMAN, T., STENSTEDT, T. *2-D Electrophoresis, using immobilized gradients. Principles & methods.*: Amersham Pharmacia Biotech Inc. . 1998.
72. CHEVALIER, F., ROFIDAL, V., ROSSIGNOL, M. Plant proteomics: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 2006. 355, s. 145 - 156.
73. LÓPEZ-FERRER, D., CANAS, B., VÁZQUEZ, J., LODEIRO, C., RIAL-OTERO, R., MOURA, I., CAPELO, J.L. Sample treatment for protein identification by mass spectrometry-based techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 2006. 25(10), s. 996-1005.
74. KADLČÍK, V., KODÍČEK, M., HASSMAN, M. Využití hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF pro studium prostorové struktury proteinů. *Chemicke Listy*, 2002. 96, s. 618 - 623
75. VORM, O., ROEPSTORFF, P., and MANN, M. Improved Resolution and Very High-Sensitivity in Maldi ToF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Analytical Chemistry*, 1994. 66(19), s. 3281-3287.
76. GOBOM, J., et al. alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Analytical Chemistry*, 2001. 73(3), s. 434-438.

77. FIGEYS, D. *Industrial Proteomics: Applications for Biotechnology and Pharmaceuticals*: John Wiley & Sons, Inc. 2005. ISBN 0-471-45714-0.
78. EZZELL, C. Proteomics-Biotech's Next Big Challenge. *Scientific American*, 2002(28)
79. ŠEDA, O., LIŠKA, F., ŠEDOŤÁ, L. *Aktuální genetika*. verze 1.0: 1.LF UK. 2005.
80. KUSSMANN, M., et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *Journal of Mass Spectrometry*, 1997. 32(6), s. 593-601.
81. ZENOBI, R. and KNOCHENMUSS, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 1998. 17(5), s. 337-366.
82. ASHCROFT, A.E. *An Introduction to Mass Spectrometry*: University of Leeds. 2007.
83. ABIAN, J. 1999. *J Mass Spectrom.* 34, s. 157-168.
84. ŠTULÍK, K., A KOLEKTIV. *Analytické separační metody*, Praha: Karolinum 2004.
85. KHANDURINA, J. and GUTTMAN, A. Bioanalysis in microfluidic devices. *Journal of Chromatography A*, 2002. 943(2), s. 159-183.
86. FIORINI, G.S. and CHIU, D.T. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. *Biotechniques*, 2005. 38(3), s. 429-446.
87. YINGJIE, L., FOOTE, R.S., CULBERTON, CH.T., JACOBSON, S.C., RAMSEY, R.S., RAMSEY, J.M. *Electrophoretic Separation of Proteins on Microchips*, Oak Ridge, TN, USA: Oak Ridge National Laboratory. 2000.
88. BROYLES, B.S., JACOBSON, S.C., and RAMSEY, J.M. Sample filtration, concentration, and separation integrated on microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 2003. 75(11), s. 2761-2767.
89. MCCLAIN, M.A., et al. Microfluidic devices for the high-throughput chemical analysis of cells. *Analytical Chemistry*, 2003. 75(21), s. 5646-5655.
90. KRISHNAN, M., et al. Microfabricated reaction and separation systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001. 12(1), s. 92-98.
91. ZHANG, Z.L., et al. In situ bio-functionalization and cell adhesion in microfluidic devices. *Microelectronic Engineering*, 2005. 78-79, s. 556-562.
92. LION, N., et al. Why the move to microfluidics for protein analysis? *Current Opinion in Biotechnology*, 2004. 15(1), s. 31-37.
93. BAREA, J.L., ARIZA, J.L.G. Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics*, 2006. 6, s. 51-62.
94. MIRANDA, C.D., ROJAS, R. Copper accumulation by bacteria and transfer to scallop larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 2006. 52, s. 293-300.
95. BLACKSTOCK, W.P. and WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *TRENDS in Biotechnology*, 1999. 17, s. 121-127.
96. SCHULZ-KNAPPE, P., ZUCHT, H. D., HEINE, G., JURGENS, M., HESS, R., SCHRADER, M. Peptidomics: The comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 2001. 4, s. 207-217.
97. DOMON, B., AEBERSOLD, R. Challenges and opportunities in proteomics data analysis. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2006. 5, s. 1921-1926.
98. VILLAS-BÔAS, S.G., NIELSEN, J., SMEDSGAARD, J., HANSEN, M. A. E.. *Metabolome analysis: an introduction*. 1st edition: Wiley-Interscience. 2007. ISBN-13: 978-0471743446.

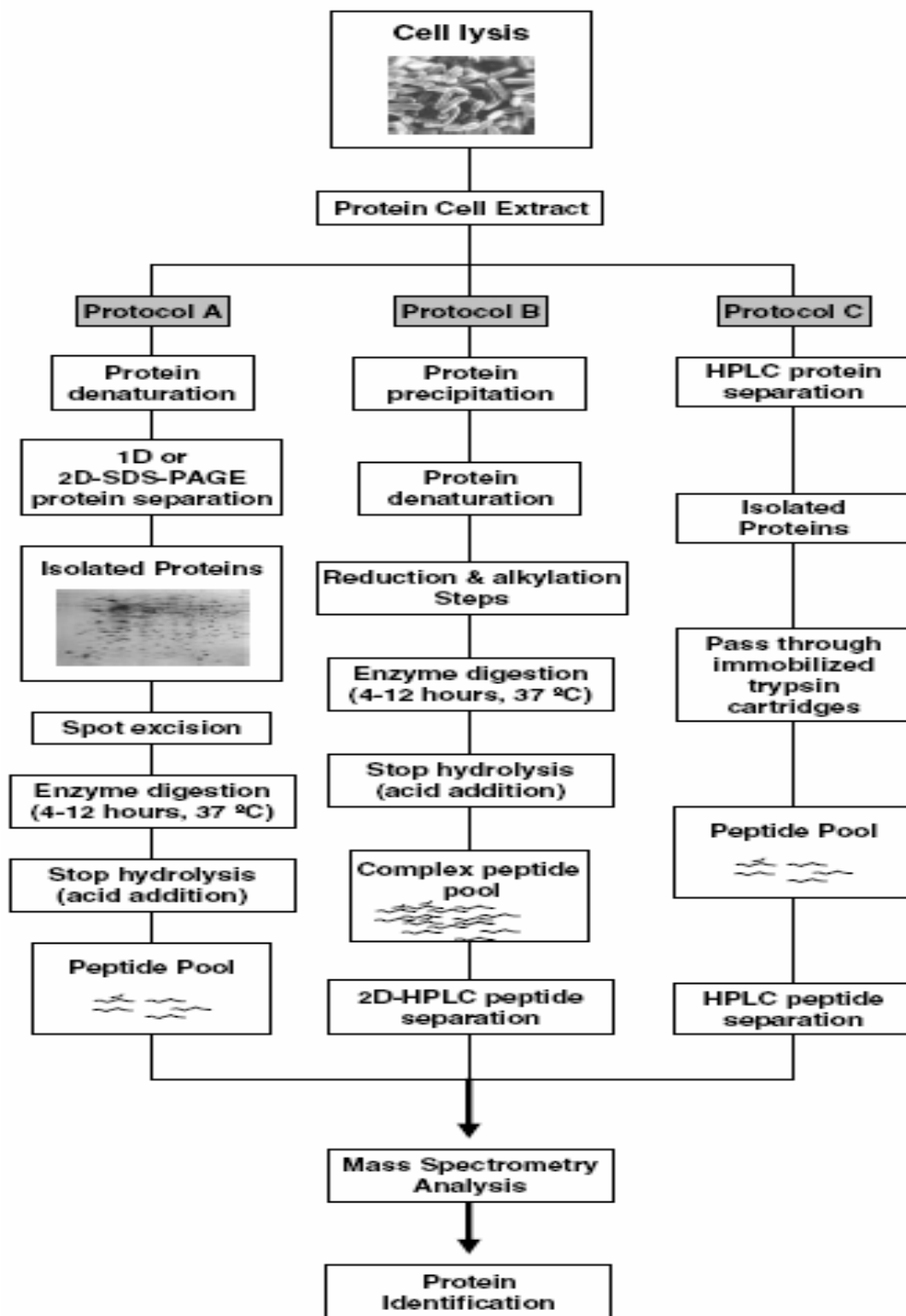
99. MÁROVÁ, I., BREIEROVÁ, E., KOČÍ, R., FRIEDL, Z., SLOVÁK, B., POKORNÁ, J. Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. *Annals of Microbiology*, 2004. 54(1), s. 73–85.
100. KOČÍ, R.D., MICHAELA; MÁROVÁ, IVANA. Production of industrial metabolites by red yeasts in stress conditions. *Chemicke Listy*, 2005. 99, s. 297-298.
101. MÁROVÁ, I.H., A.; ČARNECKÁ, M. *Regulation of carotenoid production in Rhodotorula glutinis by exogenous stress factors and by chemical mutagenesis - a comparative study*, in ČSBMB. 2006: Piešťany. s. 372.
102. HOFFMAN, G., GARRISON, T.R., DOHLMAN, H.G. Analysis of RGS proteins in *Saccharomces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, 2002(344), s. 617-631.
103. KUSHNIROV, V.V. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, 2000. 16, s. 857-860.
104. ROCHA, A.M.C.N., MORAIS, A.M.M.B. . Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from Jonagored apple. *Food Control*, 2001. 12, s. 85-90.
105. MIKKELSEN, S., CORTOÓN, E. *Bioanalytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc. 2004. ISBN 0-471-54447-7.
106. GHARAHDAGHI, F., WEINBERG, C.R., MEAGHER, D.A., IMAI, B.S., MIACHE, S.M.: Electrophoresis. 1999. 20, s. 601-605.
107. ZHU, K., NGUYEN, M., STRONG, W., WHITMAN-GULIAEV, CH.: *Protein Sizing, Quantitation, and Analysis Using the Experion Automated Electrophoresis System: A Comparison With SDS-PAGE*, in *BioRadiations*. 2005. s. 22.
108. BŘEZINOVÁ BELCREDI, N., EHRENBERGEROVÁ, J., PRÝMA, J., HAVLOVÁ, P. Stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy pomocí soupravy Ransod v rostlinném materiálu. *Chemicke Listy*, 2007. 101, s. 504-508.
109. KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. , Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, . 2006. ISBN 80-7080-586-2.
110. STEPHANE, M., ET AL. Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase. *In Phytochemistry*, 1998, s. 1213-1217.
111. PARK, P.K., KIMA, E.Y., CHUB, K.H. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology*, 2007. 53, s. 148–152.
112. KOČÍ, R. *Vliv stresových podmínek na metabolickou aktivitu kvasinek*. Dizertační práce, Brno: FCH VUT. 2004.
113. ZLOCH, Z., ČELAKOVSKÝ, J, AUJEZDSKÁ, A. *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu*. 2004 [cit. 2009-06-07]; Dostupné z: <http://www.danoneinstitut.cz/files>.
114. ČARNECKÁ, M. *Molecular study of intracellular changes as response of microorganisms to environment*. Dizertačná práce, Brno: FCH VUT. 2009.
115. MAROVA, I., CARNECKA, M., HALIENOVA, A., BREIEROVA, E., KOCI, R. Production of Carotenoid-/Ergosterol-Supplemented Biomass by Red Yeast *Rhodotorula glutinis* Grown under External Stress. *Food Technology and Biotechnology*, 2010. 48(1), s. 56–61. ISSN 1330-9862.
116. MÁROVÁ, I., BREIEROVÁ, E., KOČÍ, R., FRIEDL, Z., SLOVÁK, B., POKORNÁ, J. Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. *Annals of Microbiology*, 2004. 54(1), s. 73-85.

117. MÁROVÁ, I., ČARNECKÁ, M., HALIENOVÁ, A., KOČI, R. Changes in red yeast cells during production of beta-carotene and ergosterol controlled by physiological stress. *Febs Journal*, 2008. 275, s. 414-414.
118. KOČÍ, R., DRÁBKOVÁ, M., MÁROVÁ, I. Production of industrial metabolites by red yeasts in stress conditions. *Chemické Listy*, 2005. 99, s. 297-298. ISSN: 0009-2770.
119. ČARNECKÁ, M., HÁRONIKOVÁ, A., DVOŘÁKOVÁ, T., HALIENOVÁ, A., MÁROVÁ, I., BREIEROVÁ, E. Characterization of beta-carotene enriched biomass production by red yeasts. *Chemické Listy*, 2008. 102 (S), s. 615-616. ISSN 1803-2389.
120. SKINNER, C.E. *Henrici s MOLDS, YEASTS, and ACTINOMYCETES A Handbook for Students of Bacteriology*. 2007, Read Country Books.
121. HORVATH, A., RIEZMAN, H. Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1994. 10(10), s. 1305-1310.
122. GROMOVA, I., CELIS, J.E. (2006) *Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass-Spectrometry. Cell Biology: A Laboratory Handbook*.
123. GARRELS, J.I., FUTCHER, B., KOBAYASHI, R., LATTER, G.I., SCHWENDER, B., VOLPE, T., WARNER, J. R., MCLAUGHLIN, C. S. . Protein identifications for a *Saccharomyces cerevisiae* protein database. *Electrophoresis*, 1994. 15, s. 1466–1486.
124. GARRELS, J.I. Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis*, 1997. 18, s. 1347-1360.
125. ROP, O., KRAMÁŘOVÁ, D., JURÍKOVÁ, T., JANÍK, M., HOZA, I., MLČEK, J., VALÁŠEK, P. Chemical Characteristics of Fruit in Selected Local Apple Varieties. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 2009, s. 573-579.
126. PETROVA, V.J., RASHEVA, T. V., KUJUMDZIEVA, A. V. Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2002. 5(1)
127. WEEMAES, C.A., ET AL. . Activity, Electrophoretic Characteristics and Heat Inactivation of Polyphenoloxidases from Apples, Avocados, Grapes, Pears and Plums. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 1998. 31, s. 44-49.
128. VALDERRAMA, P., CLEMENTE, E. Isolation and thermostability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars Gala and Fuji. *Food Chemistry*, 2004. 87(4), s. 601-606
129. VODRÁŽKA, Z., RAUCH, P., KÁŠ, J. *Enzymologie 2*. Vol. 2. vydání: VŠCHT Praha. 1991. ISBN 80-7080-124-7
130. LHOTSKÝ, A. *Pivovarská enzymologie*. Vol. 1. vydání: SNTL Praha. 1971.
131. HUGHES, M., BOIVIN, P., GAUILLARD, F., NICOLAS, J., THIRY, J.-M., RICHARD-FORGET, F. Two lipoxygenases from germinated barley-heat and kilning stability. *Journal of Food Science*, 1994. 59(4), s. 885-889
132. KAUKOVIRTA-NORJA, A., REINIKAINEN, P., OLKKU, J., LAAKSO, S. Influence of Barley and Malt Storage on Lipoxygenase Reaction. *Cereal Chemistry*, 1998. 75(5), s. 742-746.
133. KURODA, H., KOJIMA, H., KANEDA, H., TAKASHIO, M. Characterization of 9-Fatty Acid Hydroperoxide Lyase-Like Activity in Germinating Barley Seeds That Transforms 9(S)-Hydroperoxy-10(E),12(Z)-octadecadienoic Acid into 2(E)-Nonenal. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005. 69(9), s. 1661–1668.
134. LEJA, M., MARECZEK, A., BEN, J. Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. *Food Chemistry*, 2003. 80, s. 303–307.

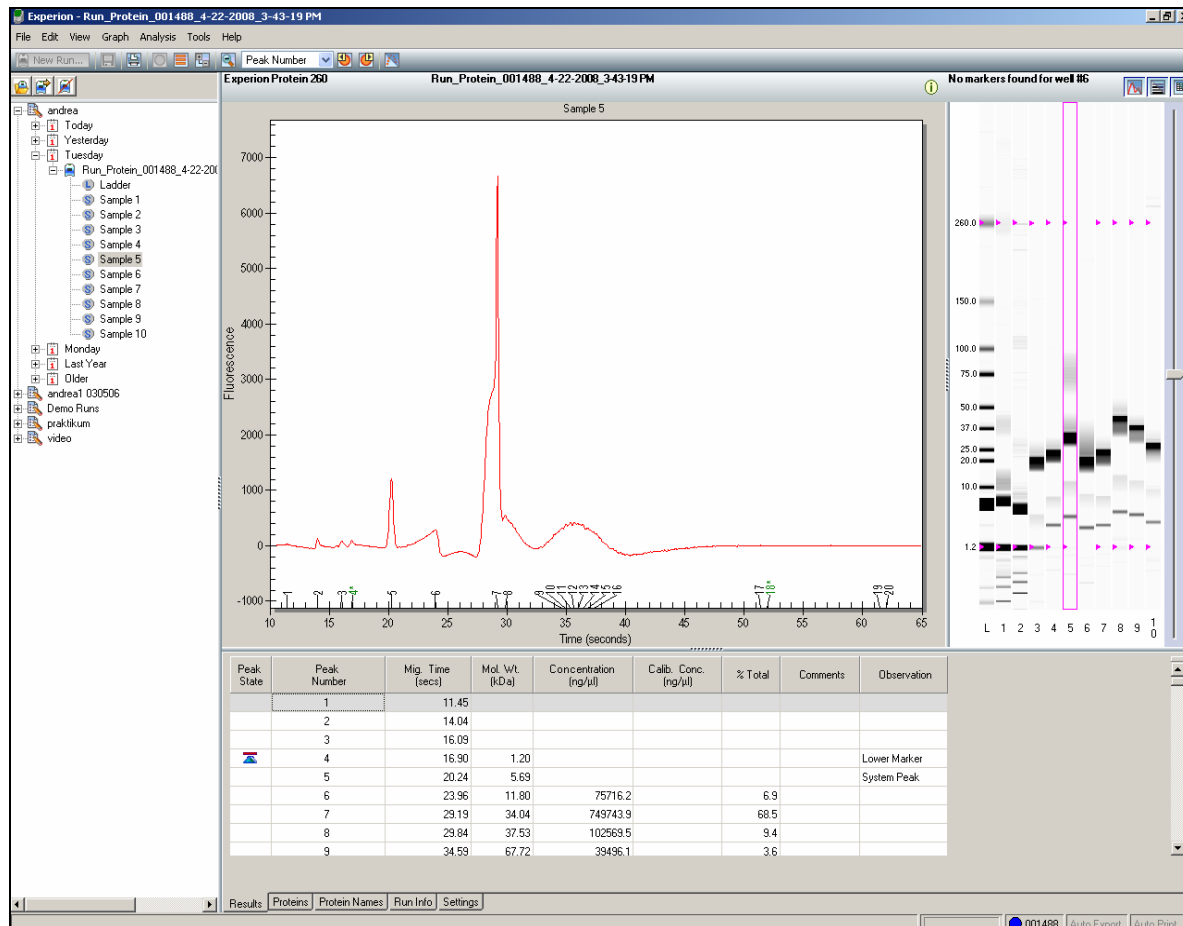
135. D'ABROSCA, B., PACIFICO, S., CEFARELLI, G., MASTELLONE, C., FIORENTINO, A. 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2007
136. LOPEZ, J.L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2007. 849(1-2), s. 190-202.

10 PRÍLOHY

Príloha 1: Možnosti použitia digescie pomocou enzýmov pred MS analýzou proteínov [69]



Príloha 2: Kvalitatívne vyhodnotenie mikročipovej elektroforézy pre analýzu proteínov z jablák, vzorka číslo 5



Príloha 3: Tabuľka molekulových hmotností proteínov izolovaných z jablka odrody Jonagored (uchovávané v normálnej atmosfére), separovaných pomocou mikročipovej elektroforézy

Peak State	Peak Number	Mig. Time (secs)	Mol. Wt. (kDa)	Concentration (ng/μl)	Calib. Conc. (ng/μl)	% Total	Comments	Observation
	1	11.45						
	2	14.04						
	3	16.09						
	4	16.90	1.20					Lower Marker
	5	20.24	5.69					System Peak
	6	23.96	11.80	75716.2		6.9		
	7	29.19	34.04	749743.9		68.5		
	8	29.84	37.53	102569.5		9.4		
	9	34.59	67.72	39496.1		3.6		
	10	34.96	70.30	17332.4		1.6		
	11	35.40	73.26	21838.6		2.0		
	12	35.67	75.14	18873.2		1.7		
	13	35.99	78.08	15132.7		1.4		
	14	36.42	82.00	18997.0		1.7		
	15	36.80	85.43	11687.4		1.1		
	16	37.34	90.33	22873.7		2.1		
	17	51.41	252.98	88.8		0.0		
	18	51.95	260.00					Upper Marker
	19	61.44						
	20	61.98						
	21	69.10						

Príloha 4 Ukážka kvantitatívneho vyhodnotenia proteínov z *R. glutinis* (porovnanie 2% NaCl vs. 5% NaCl)

