



ÚSTAV TECHNICKÉ V BRNE

ULTA CHEMICKÁ

Ing. Andrea Halienová

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

**Autoreferát doktorskej dizertaľnej práce k získaniu vedeckej
hodnosti Ph.D.**

BRNO 2010



.....ná v rámci doktorského študijného programu
Chémia a technológia ochrany životného prostredia vo forme kombinovanej

Uchádzač: Ing. Andrea Halienová
Ústav chémie potravín a biotechnológií, FCH VUT Brno, ČR

Oponenti: prof. RNDr. Emanuel Šucman, CSc.
doc. Ing. Milan Čertík, Ph.D.
prof. Ing. Eva Straková, Ph.D.

Školiteľ: Doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
ÚPCHBT FCH VUT Brno, Purkyňova 118, 612 00 Brno

Autoreferát bol odoslaný dňa:.....

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa 2.9.2010 pred komisiou pre obhajoby doktorských dizertačných prác na FCH VUT v Brne od 10 hodiny.

S dizertačnou prácou je možné sa zoznámiť na dekanáte Fakulty chemickej Vysokého učení technického v Brne, Purkyňova 118.

1	PREHODARTIKULOV OZNATKOV	6
1.1	Proteomika, genomika a ich vzťah.....	6
1.2	Vplyv stresových faktorov na metabolizmus mikroorganizmov a iných organizmov.....	6
1.2.1	Produkcia proteínov a iných metabolitov v stresových podmienkach.....	7
1.3	Karotogénne kmene kvasiniek	9
1.4	Enzymy zapojené do stresovej odozvy u mikroorganizmov a rastlín.....	9
1.5	Proteomika a životné prostredie.....	10
2	CIEŤ PRÁCE	12
3	MATERIÁL A METÓDY	13
3.1	Kvasinkové kmene, rastlinný materiál.....	13
3.2	Kultivačné podmienky.....	13
3.2.1	Kultivácia v prítomnosti stresových faktorov.....	14
3.3	Metódy použité k izolácii proteínov z komplexných vzoriek	15
3.3.1	Kvasinky	15
3.3.2	Jablká	15
3.3.3	Jačmeň a slad.....	16
3.4	Metódy analýzy proteínov	16
3.4.1	Kvasinky	16
3.4.2	Jablká	17
3.4.3	Jačmeň	17
4	VÝSLEDKY	18
4.1	Analýza proteínov izolovaných z kvasinkových mikroorganizmov.....	18
4.1.1	1D elektroforéza u proteínov z <i>R.glutinis</i> a ostatných červených kvasiniek.....	19
4.1.2	2D elektroforéza proteínov z kvasinkových organizmov	22
4.1.3	Identifikácia proteínov pomocou MALDI/MS a LC/MS/MS.....	26
4.1.4	Ukážka analýzy proteómu kvasinkových mikroorganizmov metódou mikročipovej elektroforézy.....	28
4.2	Analýza proteínov v rastlinných vzorkách.....	29
4.2.1	Jablká	29
4.2.2	Jačmene.....	30
5	ZÁVERY	32
6	REFERENCIE	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
7	PUBLIKAL'NÁ Ľ INNOŠ	40

Všetky žive organizmy su 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 výrobnách 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 cieľovou zmenou genómu alebo ovplyvnením životných podmienok látkami, ktoré dokážu vyvolať nadprodukcii nami želaného metabolitu. U červených druhov kvasiniek sú žiadanými metabolitmi karotenoidy, ktoré majú antioxidantný charakter. Cieľovou 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

rozpoznanie metabolizmu kvasiniek po aplikácii
schopnosť rozpoznať a určiť zmeny, ktoré
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 pozorovať vplyv okolia na rastlinné vzorky, pričom je následne možné navrhnúť vylepšené spôsoby uchovávaní 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 uchovávaní.

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.

1.1 Proteomika, genomika a ich vzťah

Medzi uchovanou genetickou informáciou – génom a funkčným reprezentantom – proteóm prebieha niekoľko vysoko komplexných dejov, ako je transkripcia génovej sekvencie a translácia v proteíny, transportné javy i posttranslačné modifikácie. Zatiaľ čo génom 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 génomom najmä preto, že akýkoľvek environmentálny alebo biologický parameter ovplyvňuje expresiu proteínu. Koncentrácie jednotlivých proteínov sa menia podľa aktuálnych potrieb organizmu [1, 2].

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 [3].

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 [3].

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. 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.

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 [8].

1.2.1.1 Vplyv teploty

Vplyv vyššej teploty na bunky vedie k ich denaturácii – dochádza k rozpadu vodíkových väzieb a rušeniu hydrofóbnych 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 [4].

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 [4].

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 žiaduceho metabolitu [4, 9].

***Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features***

Oxidálny 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 [4].



Obr. 1 Ciele reaktívnych molekúl v bunke [10]

Štruktúra proteínov a ich funkcia môže byť zmenená vplyvom reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré produkujú organizmy, alebo sú vyvolané vonkajšími stresovými faktormi. Hoci antioxidantné enzýmy prispievajú k udržiavaniu netoxickej úrovne, napriek tomu dochádza k modifikácii aminokyselinových reťazcov [11].

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,

naký spin. Keď jeden z týchto nespárených spin, výsledná molekula (singletový kyslík) sa 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 [11].

Na obranu voči reaktívnym formám kyslíka obsahujú bunky antioxidačné enzýmy – superoxiddismutáza, kataláza, rôzne peroxidázy, a tiež antioxidanty – kyselina askorbová, tokoferol, či glutathion [12].

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 [4].

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. Druhovo patria tieto kvasinky do čeľadí *Rhodotorulaceae* a *Sporobolomycetaceae* [4].

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 [13].

1.4 Enzýmy zapojené do stresovej odozvy u mikroorganizmov a rastlín

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

sa svojim vplyvom prekrývajú. Jednotlivé ni biochemickými aktivitami môžu operovať príklad v cytosole a v mitochondriách [11].

Superoxiddismutáza, kataláza a peroxidáza, tzv. antioxidačné enzýmy, 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 [14].

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 [15].

1.5 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.

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 cielené 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 [16, 17]. 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 [18].

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, a sekundárne antioxidačné enzýmy ako thioredoxíny či glutaredoxíny sú indukované po vystavení vplyvu polutantov [19].

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



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

omické techniky môžu identifikovať proteíny
vení pôsobeniu polutantov a po validácii môžu
émom je doteraz nezmapovaný genóm väčšiny
organizmov, čo robí následne problémy pri identifikácii proteínov pomocou
MALDI-TOF [19].

štúdium vplyvu rôznych typov stresových podmienok na vybrané organizmy – 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

V práci boli použité kvasinkové kmene *Rhodotorula glutinis* (CCY 20-2-26 a CCY 20-2-33), *Rhodotorula rubra* (*mucilaginoso*) (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) a *Cystofilobasidium capitatum* (CCY 10-1-1 a CCY 10-1-2). Ako porovnávací kmeň bola použitá kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (CCY 21-4-88).

Na analýzu proteínov z jabĺk boli testované jablká zakúpené v bežnej obchodnej sieti (odrody Jonagold, Topaz, Gloster, Melinda, Sudtirol, Šampión). Pre analýzu antioxidantných enzýmov boli použité tri odrody jabĺk – Idared, Golden Delicious a Jonagored.

Pre enzýmovú analýzu a celkovú antioxidantnú aktivitu jačmeňov a sladov boli použité nasledovné vzorky (Tab. 1).

Tab. 1 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

3.2 Kultivačné podmienky

Všetky kvasinkové kmene 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 autolyzáta, produkčné médium bolo namiešané podľa

Tab. 2 a

následne pripravené na použitie. Použité kmene mikroorganizmy, takže kultivácia prebiehala pri V priebehu celej kultivácie bolo stále osvetlenie, ktoré aktivovalo tvorbu karotenoidov.

Tab. 2 kultivačné médium základné

Zložka	Inokulum	Produkcia
Glukosa	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. 3 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. 4 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

3.2.1 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 [20-22].

K indukciu 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.

3.3.1 Kvasinky

Po rôznorodej optimalizácii metód boli pre izoláciu proteínov z kvasiniek vybrané dve hlavné techniky – s použitím NaOH a SDS.

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 premiešaní na vortexe bola zmes inkubovaná 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 [23].

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.

3.3.2 Jablká

Príprava vzoriek pre analýzu proteínov

Zvážené jablká boli zbavené jadier a za chladu dezintegrované spoločne so šupkou. 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 nanesenie. 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.

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.

spracovania jabĺk (Tab. 5), ktorými bolo bolo vždy nastrúhané na plastovom strúhadle

Tab. 5 Izolačné postupy pre antioxidačné 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 polyvinylpyrrolidonu a 1 ml Tritonu X-100 [24].
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 polyvinylpyrrolidonu a 1 ml Tritonu X-100 do zmesi [24].

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

3.3.3 JaľmeĖa 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.

3.4 Metódy analýzy proteínov

3.4.1 Kvasinky

Proteíny z kvasiniek boli po izolácii separované pomocou 1D elektroforézy (všetky kmene, 10 a 12,5% gély) a 2D elektroforézy (*R. glutinis* a *R. rubra*). Vybrané zóny proteínov po 2D elektroforéze boli následne charakterizované pomocou hmotnostnej spektrometrie. Testovaná bola aj metóda separácie proteínov pomocou mikročipovej elektroforézy. 2D a MS analýzy boli prevedené v spolupráci s Laboratóriom funkčnej genomiky a proteomiky PĖF MU v Brne.

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. Prístroj pri zbere MS dát pracoval v reflektónovom móde s detekciou pozitívnych iónov. Jednotlivé vzorky (1 µl) boli nanosené na vzorkovaciu 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 Daltonic).

Na spracovanie MS a MS/MS dát bol použitý vyhľadávací program MASCOT 2.2 (MatrixScience, UK). K databázovému vyhľadávaniu bola použitá NCBI proteínová

separácia pre MALDI-MS dáta bola pre peptidové dáta 0,6 Da. Vyhľadávanie bolo prevedené bez MS experimenty boli prevedené v spolupráci s laboratóriom funkčnej genomiky a proteomiky PŘF MU v Brne.

3.4.2 Jablká

Proteíny zo vzoriek jablák boli analyzované rôznymi metódami. Na celkové proteíny bola použitá Lowryho metóda, separácia proteínov bola prevedená pomocou 1D elektroforézy a mikročipovej elektroforézy, pričom na presnejšiu identifikáciu bola použitá aj metóda Western Blot (v spolupráci s laboratóriami Max F Perutz, University Vienna, oddelenie chromozómovej biológie). Enzýmovou analýzou boli namerané aktivity enzýmov superodiddismutáza, kataláza a polyfenoloxidáza. Aktivita enzýmu superoxiddismutáza bola stanovovaná pomocou kitu Ransod od firmy Randox. Stanovenie aktivity katalázy bolo prevedené spektrofotometricky pri 240 nm, spektrofotometricky prebehlo aj stanovenie polyfenoloxidázy pri 400 nm. Princíp stanovenia spočíva v reakcii roztoku 4-methylkatecholu s kyslíkom a PPO za vzniku oranžového roztoku benzochinónu, ktorý sa následne pomalou reakciou s vodou mení na hnedý melanín.

3.4.3 JaľmeŘ

Vo vzorkách jaľmeňa a následne sladu bol stanovený enzým lipoxygenáza, spektrofotometricky v UV oblasti pri 234 nm. Princíp metódy spočíva v reakcii nenasýtených mastných kyselín s kyslíkom a lipoxygenázou za vzniku peroxidov nenasýtených mastných kyselín [25].

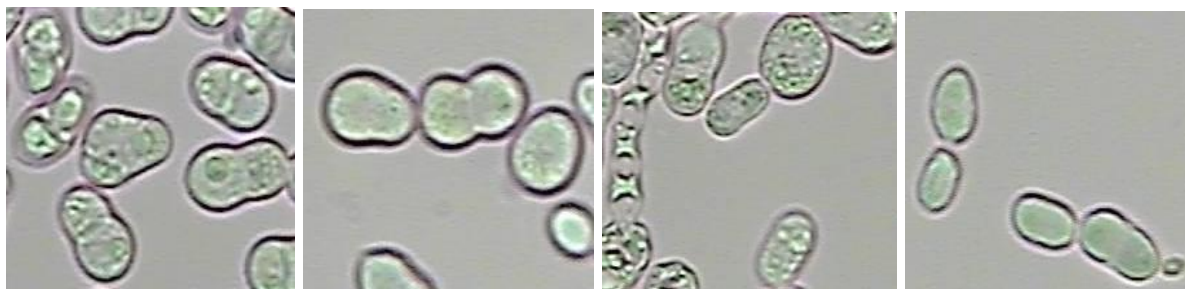
4.1 Analýza proteínov izolovaných z kvasinkových mikroorganizmov

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 H_2O_2 . Sady proteínov boli porovnávané s proteínmi vyizolovanými z buniek kultivovaných za normálnych podmienok. Po izolácii proteínov boli najprv boli prevedené 1D elektroforézy, 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.

Sledovanie stresovej odozvy bolo zaznamenávané aj na metabolómovej úrovni, zhrnutie tejto časti je uvedené v záveroch autoreferátu. Ako hlavný modelový organizmus bola vybratá kvasinka *Rhodotorula glutinis*, proteínové profily a antioxidačné látky však boli sledované aj na ostatných karotogénnych kmeňoch.

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. Zmeny morfológie je možné vidieť u kvasinky *Rhodotorula glutinis* (Obr. 2).



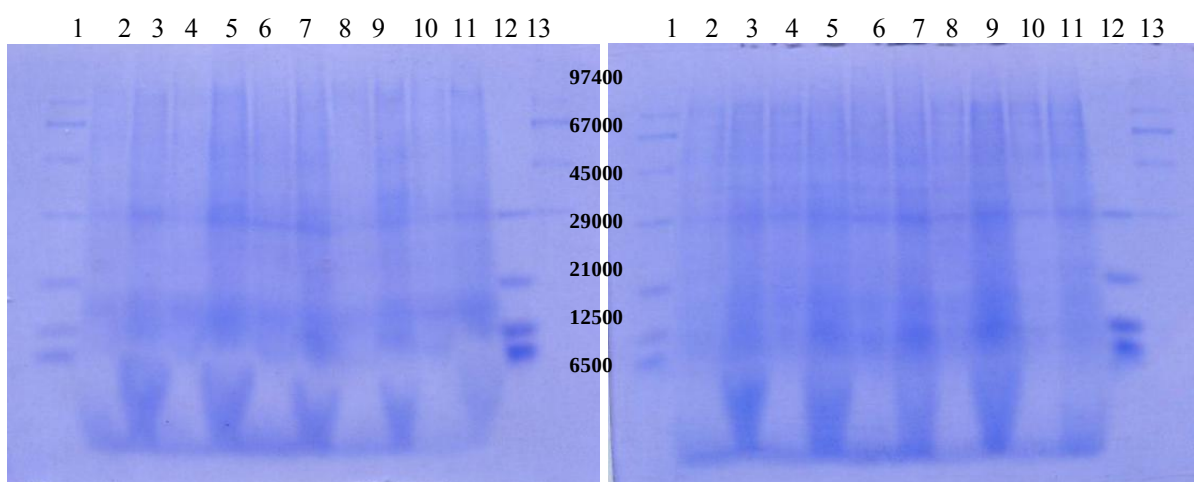
Obr. 2 Morfológia buniek *Rhodotorula glutinis* po raste v prítomnosti stresových faktorov, zľava: 5mM H_2O_2 , 2mM H_2O_2 , 2% NaCl, 5% NaCl

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

stavené rastu v stresových podmienkach majúenie bunkovej steny z dôvodu vyššieho obsahuvých podmienok produkujú. Zmeny morfológieu ostatných kmeňov boli porovnateľné so zmenami u kvasinky *Rhodotorula glutinis*.

4.1.1 1D elektroforéza u proteínov z *R.glutinis* a ostatných kvasiniek

Bunky kmeňa *Rhodotorula glutinis* kultivované za normálnych aj stresových podmienok boli dezintegrované za použitia sklenených guľičiek, NaOH a SDS. Proteínové extrakty boli po predpríprave so vzorkovým pufrom nanosené na gél pre 1D elektroforézu. Na vyhodnotenie elektroforetogramov boli použité dva druhy farbenia – Coomassie Brilliant Blue (CCB) a striebro.



Obr. 3 1D elektroforéza bielkovín izolovaných z kmeňa *Rhodotorula glutinis*, vľavo proteíny izolované pomocou metódy s NaOH, vpravo proteíny izolované pomocou SDS, farbenie CCB

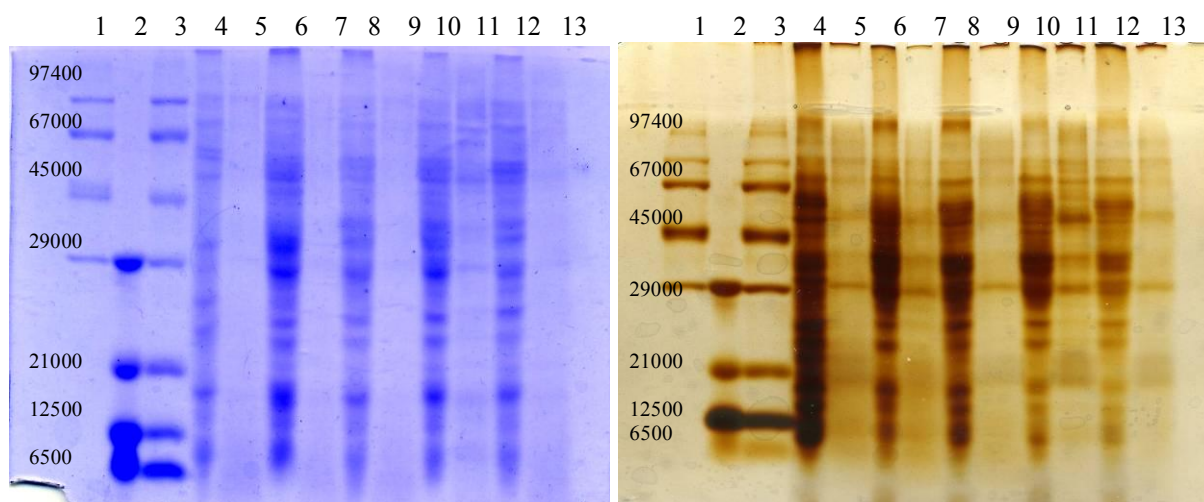
Podmienky separácie: 12,5% PAGE gél, 60 V, 100 mA, 8 hod

Tab. 6 Popis nanážík k Obr. 3 (pozn. popisy 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

ch pomocou CCB je možné identifikovať zóny 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 [26]. 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.

Aj proteíny z kvasiniek rodu *Sporobolomyces* boli podrobené separácii pomocou 1D elektroforézy. Preto je uvedená ukážka elektroforetogramov u kmeňa *Sporobolomyces shibatanus*. Elektroforetogramy boli farbené s Coomassie Brilliant Blue a striebrom.



Obr. 4 Elektroforéza bielkovín izolovaných zo *Sporobolomyces shibatanus*, vľavo farbenie CCB, vpravo farbenie striebrom

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

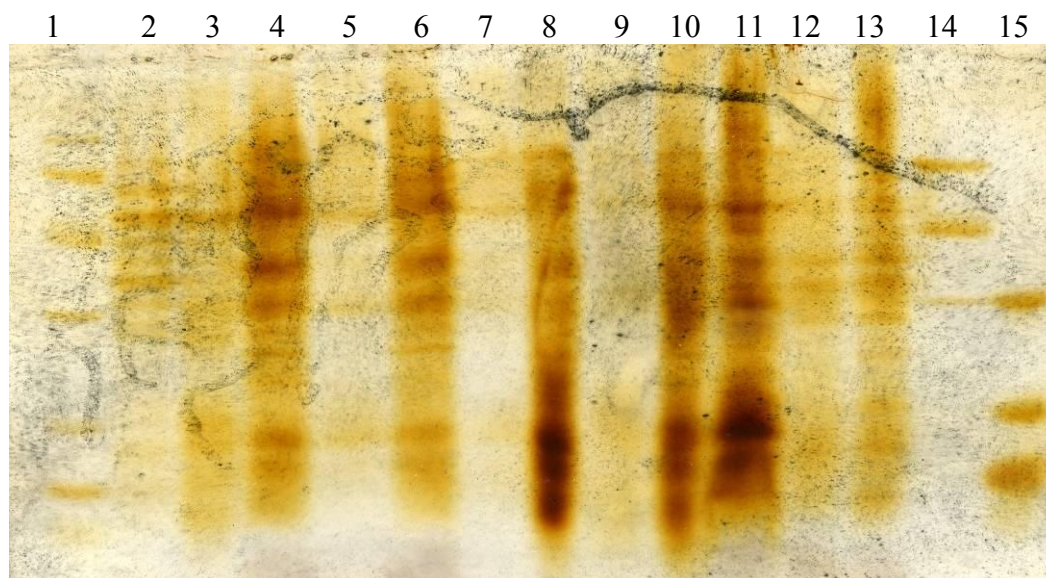
Tab. 7 Popis nanájak k Obr. 4

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

5 % NaCl, izolácia SDS
2 % NaCl, izolácia NaOH
2 % NaCl, izolácia SDS

Vyizolované proteíny boli pekne viditeľné u všetkých vzoriek. Pri farbení s CCB (Obr. 4, vľavo) sú dobre patrné len proteíny izolované s NaOH (línies 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 (línies 12). Po zopakovaní analýzy s následným farbením striebrom (Obr. 4, vpravo) bol získaný lepší výsledok. Keďže farbenie striebrom vykazuje vyššiu citlivosť, tak boli viditeľné aj zóny proteínov po izolácii s SDS (línies 5, 7, 9, 11, 13).

Celkovo je možné 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*.



Obr. 5 Porovnanie proteínových zložení testovaných kvasiniek

Tab. 8 Popis nanážík k Obr. 5

dráha vzorky	popis vzorky
1	proteínová zmes 6

	- izolácia NaOH
	- izolácia SDS
	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

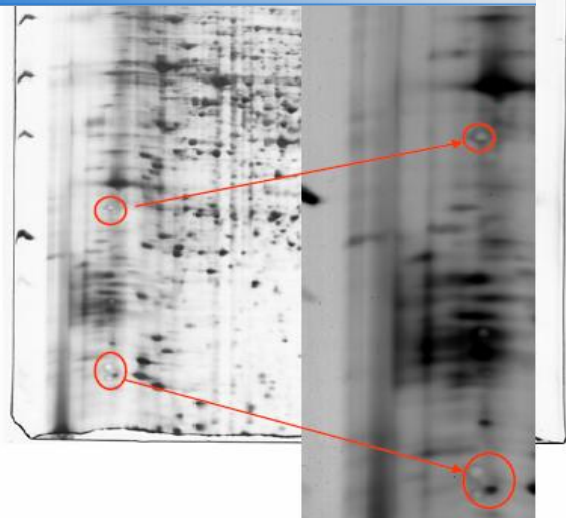
Keďže *Rhodotorula glutinis* je kvasinka, u ktorej sa priemyselné využitie na produkciu karotenoidov javí zatiaľ ako najviac vhodné, bolo proteínové zloženie a najmä zmeny proteómu po aplikácii stresových faktorov, sledované aj pomocou 2D elektroforézy a vybrané proteíny boli identifikované pomocou MS.

4.1.2 2D elektroforéza proteínov z kvasinkových organizmov

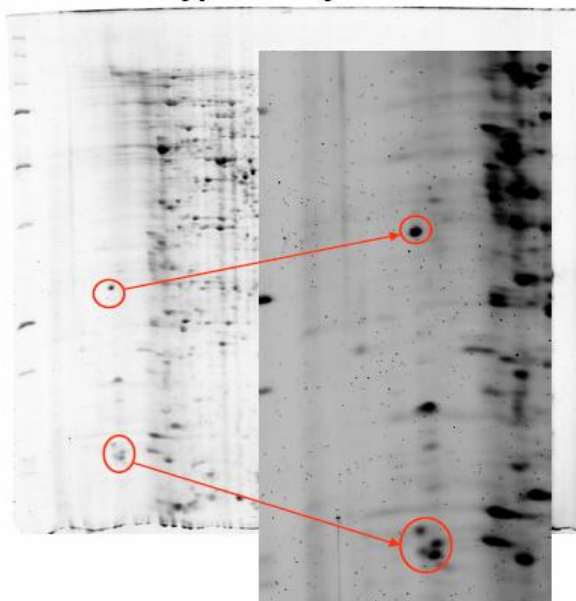
2D elektroforéza je moderný nástroj vizualizácie stoviek proteínov v čase, pričom spojenie s hmotnostnou spektrometriou vedie k ich identifikácii. Proteíny z kvasiniek majú izoelektrické body v rozmedzí od 3,1 do 12,8 a molekulové hmotnosti od 10 kDa do 470 kDa. Je preto nemožné separovať úplne všetky proteíny na jednom géle [27, 28].

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*).

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 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. 3.2.1, 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 a MS analýzy boli prevedené v spolupráci s Laboratóriom funkčnej genómiky a proteomiky Prírodovedeckej fakulty MÚ.

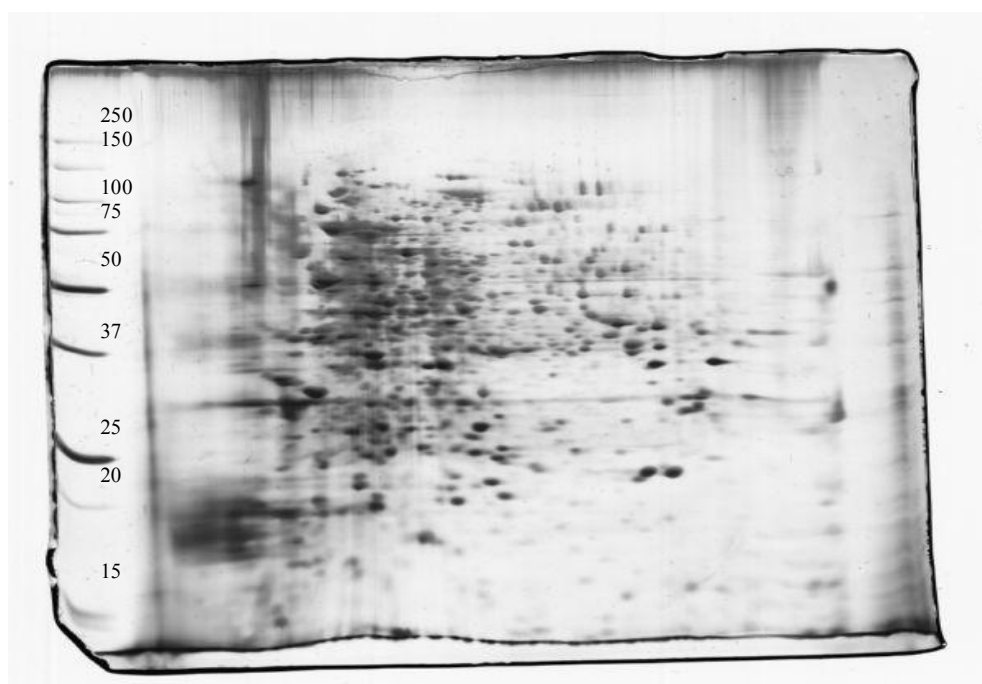


Sypro Ruby

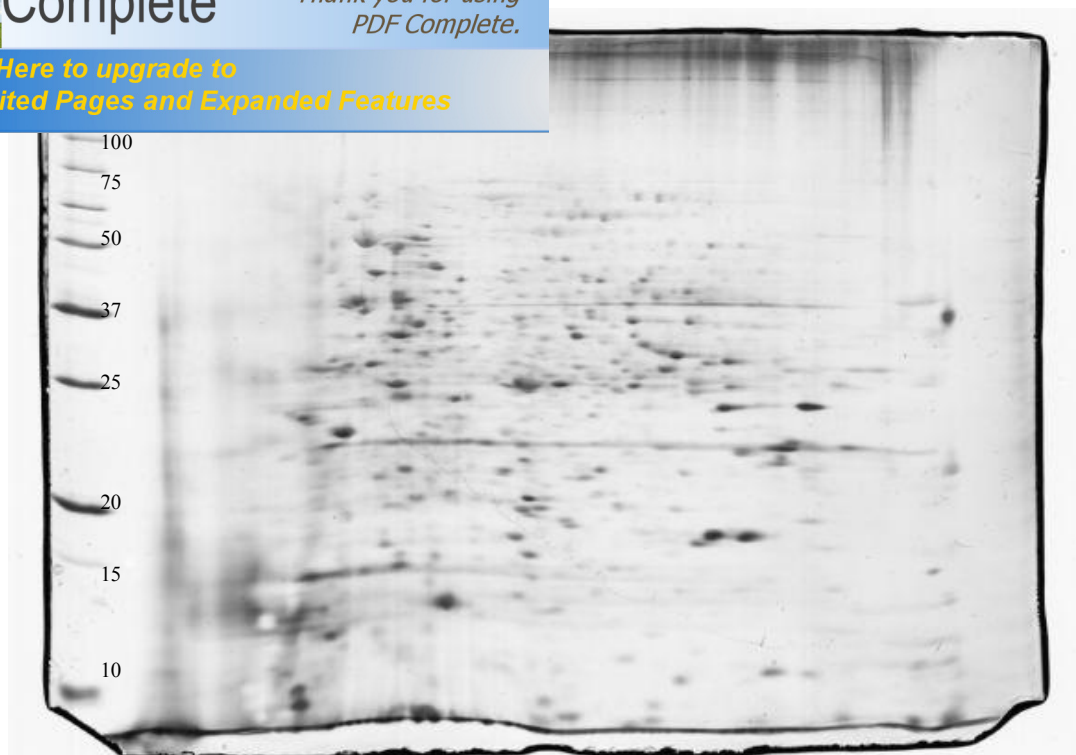


Obr. 6 Jedna z prvých 2D elektroforéz proteínov z kvasinky *Rhodotorula glutinis*, testovanie metód farbenia gélov

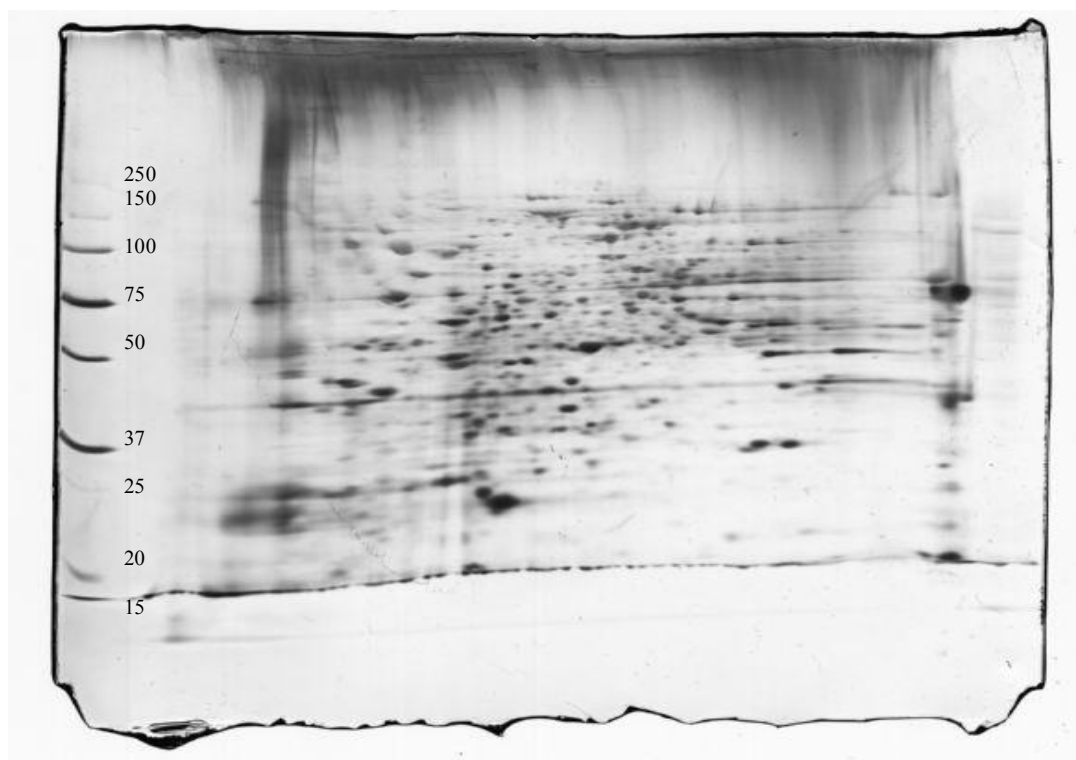
Ako proteínový štandard bol u všetkých analýz používaný Precision Plus Protein Standard (BioRad), ktorý obsahuje 10 štandardných proteínov o molekulových hmotnostiach 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, a 250 kDa.



Obr. 7 2D elektroforéza bielkovín, RG **ň** kontrola, farbenie striebrom



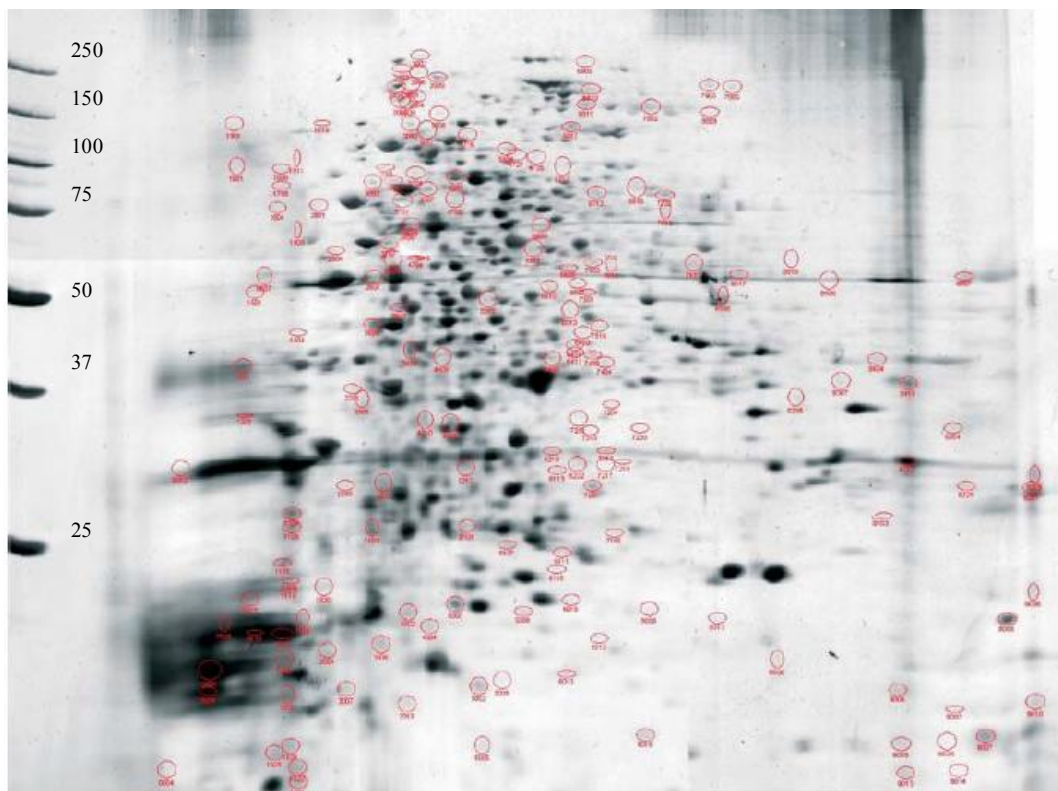
Obr. 8 2D elektroforéza bielkovín, RG ě 2mM H₂O₂, farbenie striebrom



Obr. 9 2D elektroforéza bielkovín, RG ě 5mM H₂O₂, farbenie striebrom



Obr. 10 2D elektroforéza bielkovín, RG 2% NaCl, farbenie striebrom; vyhodnotenie.



Obr. 11 2D elektroforéza bielkovín, RG 5% NaCl, farbenie striebrom, vyhodnotenie.

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

- ekované len zo stresovaných buniek, ale neboli
le (červeno zvýraznené spoty na obr.57, 58)
ie 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. 9 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, takže je možné, že sa bude týmto smerom uberať aj cieľená 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 na nižšiu koncentráciu soli.

4.1.3 Identifikácia proteínov pomocou MALDI/MS a LC/MS/MS

Súčasťou proteomických experimentov bola aj snaha identifikovať u študovaných kvasiniek jednotlivé proteíny, u ktorých došlo vplyvom stresu k významnej zmene expresie a je teda možné očakávať, že budú majoritne zapojené v metabolických

lozovou. V rámci opakovaných experimentov, pri pľacitne, proteíny boli analyzované pomocou vnvané 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). Identifikované proteíny sú lokalizované vo všetkých častiach bunky.

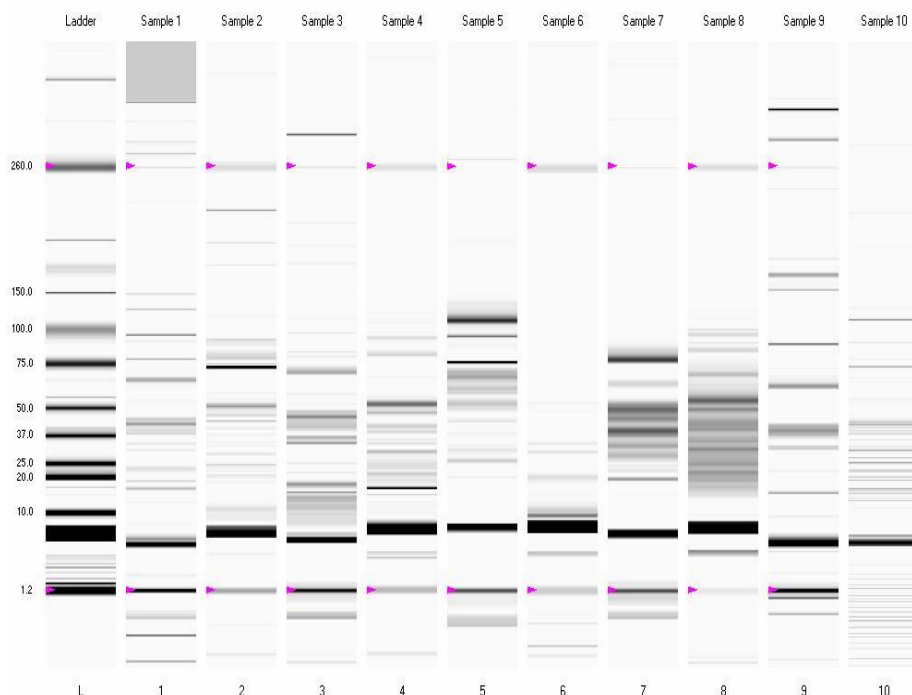
Z hlavných proteínov cytoplazmy boli opakovane identifikované napr. 6-P-glukonátdehydrogenáza (gil223641262), anorganická difosfatáza (gil121705190), ubiquitín-aktivujúci enzým (gil85078281), tryptofan-syntháza (gil170087106), glycerladehyd-3-P-dehydrogenáza (gil58268942), peroxiredoxín (gil223642857) a niektoré HSP proteíny (HSP90, HSP70). Z jadrových proteínov boli často identifikované DNA/RNA helikázy.

Mitochondriálne proteíny zahrňujú hlavne často sa opakujúcu beta podjednotku ATP syntházy (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 viacpočetne 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 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).

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

Mikročipová elektroforéza, ako aktuálny trend v rýchlej separácii proteínov na základe molekulovej veľkosti, bola vybraná najmä ako metóda porovnávacia. Jej použitím sa chcela docieľiť 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. Pre ukážku je uvedená analýza proteínov z *R. aurantiaca*.



Obr. 12 Mikročipová elektroforéza bielkovín izolovaných z *R. aurantiaca*

Tab. 10 Popis nanážík ku Obr. 12

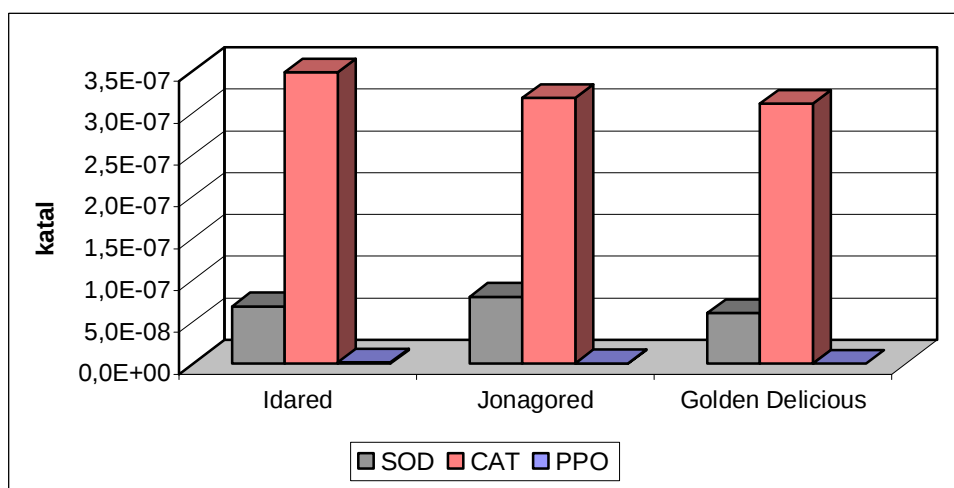
dráha vzorky	popis vzorky
L	komerčný štandard pre mikročipovú analýzu
1	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - kontrola, izolácia NaOH
2	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - kontrola, izolácia SDS
3	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> – 5mM H ₂ O ₂ , izolácia NaOH
4	proteíny z <i>R. aurantiaca</i> - 5mM H ₂ O ₂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

inných vzorkách

Za účelom aplikácie metód analýzy proteínov sú 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 prevádzkaných analýzach nízku odozvu a neprodukujú všetky zo sledovaných metabolitov.

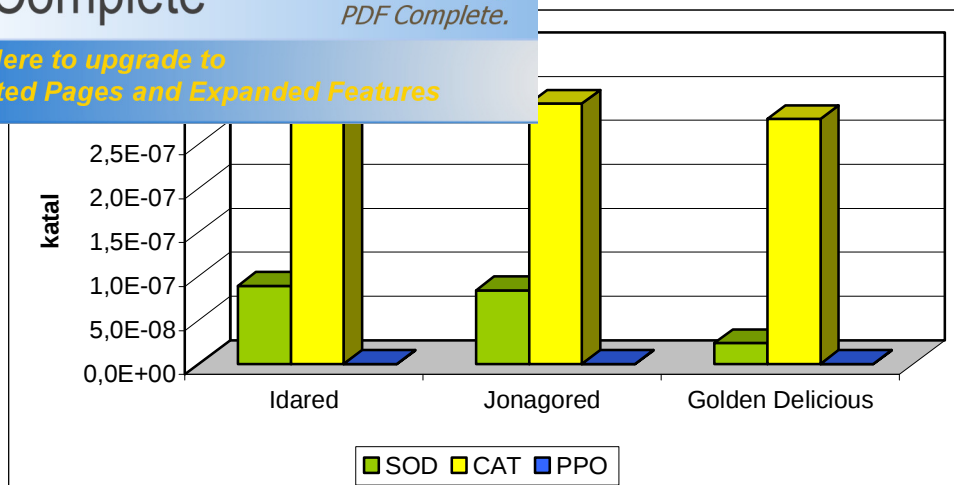
4.2.1 Jablká

Vo vzorkách jabĺk, ktoré boli vystavené rôznym druhom uchovávania, boli okrem štandardných analýz (celkové proteíny, 1D elektroforéza) prevedené najmä analýzy enzýmových aktivít u troch antioxidantných enzýmov – superoxiddismutáza, kataláza a polyfenoloxidáza. V nasledovných grafoch sú porovnané hodnoty enzýmových aktivít počas jednotlivých uchovávacích atmosfér.



Graf 1 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 jabĺk dochádza k aktivácii obranných systémov, najmä CAT a PPO.



Graf 2: Porovnanie enzýmových aktivít v jednotlivých odrodách skladovaných v modifikovanej atmosfére

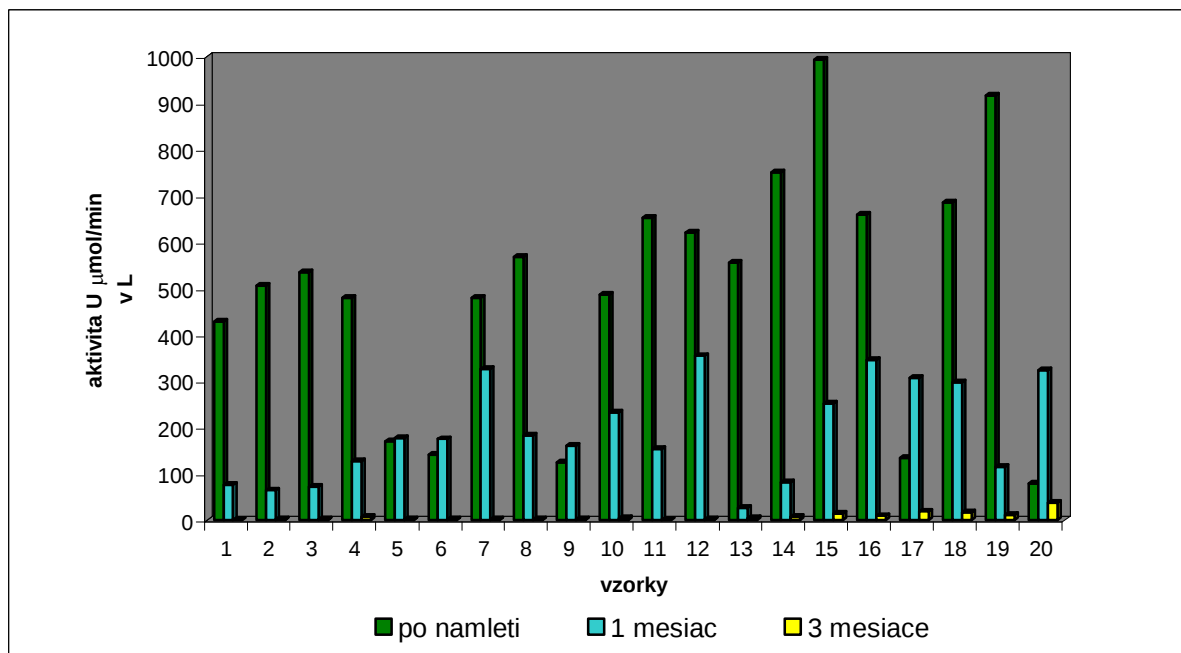
U vzoriek uchovávaných v modifikovanej atmosfére (nižší parciálny tlak kyslíku) je vidieť podobný výsledok ako u jabĺk z normálnej atmosféry – najvyššie aktivity boli zaznamenané u CAT. Druhým enzýmom v poradí je SOD a najmenšie aktivity vykazovala PPO. Na aktivitu antioxidantných enzýmov má okrem odrodových 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 antioxidantných 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, ktoré súvisia pravdepodobne aj s nižšou koncentráciou kyslíku v regulovanej atmosfére.

4.2.2 Jačmene

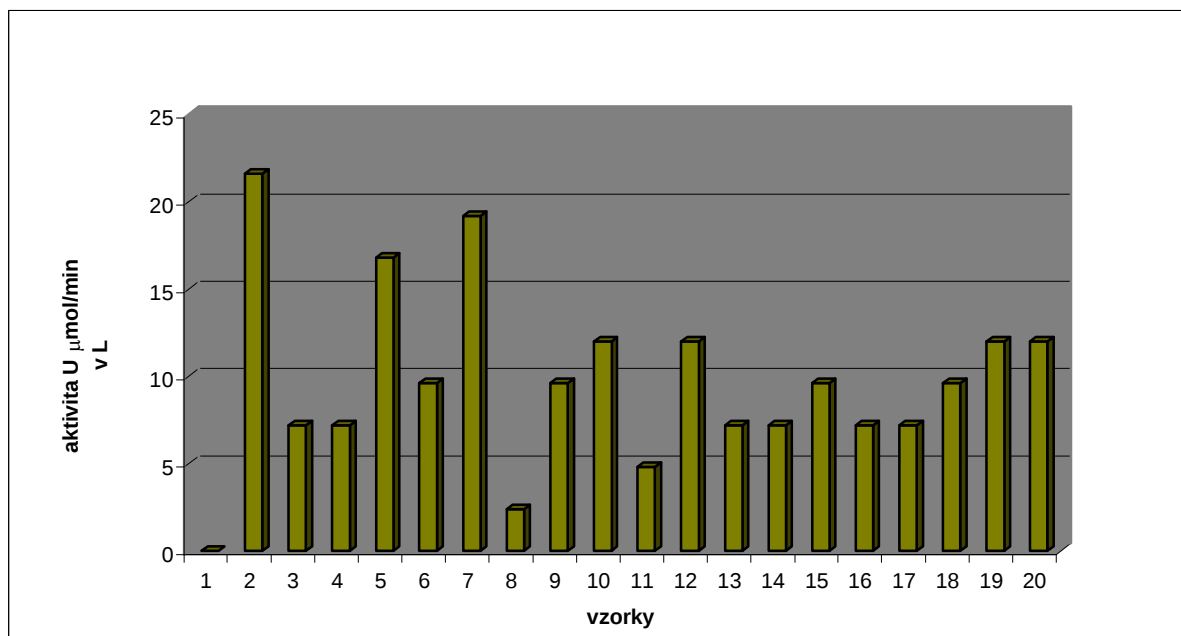
Enzým lipoxygénáza (LOX) bol stanovovaný v 20 vzorkách jačmeňa a po procese skladovania aj v následných vzorkách sladu v rámci projektu „Studium enzymatické aktivity pro zlepšení biologického potenciálu jarního sladovnického ječmene“. Čiastočným cieľom práce bolo zaznamenať aktivitu LOX vo všetkých odrodách 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 [29]. Enzým poškodzuje už uskladnený jačmeň. Jeho zhoršená kvalita po pôsobení lipoxygénázy sa prejavuje škrabľavou a horkou chuťou [30]. 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 [31].

Súčasťou experimentu bolo sledovanie zmien aktivity jednotlivých jačmeňov a sladov v čase, tj. ihneď po dodaní vzorky a jej spracovaní, po 1 mesiaci a po 3

vzoriek. raznazenané vo vzorkách hneď po dodaní, čo je doba skladovania významne vplýva na aktivitu d'alsie analýzy boli prevedené hneď po dodaní



Graf 3 Zmeny aktivity LOX-1 v jaľmeni poľas skladovania



Graf 4 Aktivita LOX-1 vo vzorkách sladov

- 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 a 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

bola určená orientačná molekulová hmotnosť na dov. Na presnejšiu identifikáciu proteínov však ešte, 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 (hodnotenie gélov triplicitne, analýza proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie, porovnávanie s dostupnými databázami), 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

Nadexprimované boli tiež samotné stresové (HSS1, thioredoxín-peroxidáza) a proteíny 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 jabĺk 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 jabĺk. Pomocou mikročipovej elektroforézy a 1D elektroforézy boli na základe molekulovej hmotnosti orientačne určené majoritné proteíny z jabĺk. 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 jabĺk uchovávaných v modifikovanej atmosfére. Na aktivitu antioxidantných enzýmov má okrem odrodových vlastností vplyv aj stupeň zrelosti plodu počas zberu a prítomnosť nízkomolekulových antioxidantov.

ta bola u všetkých odrôd jablák najnižšia vo 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 skladovania. Tiež bola nameraná celková antioxidantná aktivita. U vzoriek, kde bola nameraná vysoká aktivita LOX, bol vysoký aj celkový antioxidantný status.
- Antioxidantná obrana organizmu ako súčasť všeobecnej stresovej odozvy patrí k najkomplexnejším systémom v eukaryotických bunkách, je do nej zapojený celý rad mechanizmov a molekúl a ovplyvňuje väčšinu životných pochodov v bunke. Táto aktuálna problematika je študovaná intenzívne v rámci celosvetovej odbornej komunity. Cieľom predloženej práce bolo prispieť k poznatkom o priebehu a regulácii niektorých antioxidantných mechanizmov a možnosti ich potenciálneho priemyselného využitia.

1D	jednodimenzionálna
2D	dvojdimenzionálna
CAT	kataláza
CCB	Coomassie Brilliant Blue
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HSP	heat shock proteíny
ICDH	izocitrát dehydrogenáza
LOX	lipoxigenáza
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of flight
PAGE-SDS	polyakrylová elektroforéza za prítomnosti SDS
PřF MU	Prírodovedecká fakulta Masarykovej univerzity v Brne
PPO	polyfenoloxidáza
ROS	reaktívne formy kyslíka
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutáza
VÚPS	Výskumný ústav pivovársky a sladársky

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., KULERA, I. Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: principy a aplikace. *Chemické Listy*, 2003. 97, s. 29 - 36.
3. 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.
4. WALKER, G.M. *Yeast – Physiology and Biotechnology*, Chicester: John Wiley & Sons Ltd. 1998.
5. ATTFIELD, P.V. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, 1997. 15(13), s. 1351-1357.
6. 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.
7. SŤ TI, C., CSERMELY, P. Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease. *Journal of Biosciences*, 2007. 32(3), s. 511–515.
8. MAGER, W.H., MORADAS FERREIRA, P. Stress response of yeast. *Biochemical Journal*, 1993. 290, s. 1-13.
9. ANDREISHCHEVA, E.N., ZVYAGILSKAYA, R.A. Adaptation of yeasts to salt stress. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1999. 35(3), s. 217 – 228.
10. MERCK. *Oxidative stress. Technical overview*. [cit. 2009-08-13]; Dostupné z: http://www.merckbiosciences.co.uk/html/cbc/oxidative_stress_text.htm#cont.
11. 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.
12. 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.
13. ĞILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravinářské a biotechnologie*, Praha: Victoria Publishing. 1995. 978-80-200-17.
14. 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.
15. RAMASWAMY, H., MARCOTTE, M. *Food Processing. Principles and Applications*.: Taylor & Francis Group 2005. ISBN 1587160080.
16. BLACKSTOCK, W.P. and WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *TRENDS in Biotechnology*, 1999. 17, s. 121-127.

- VŠCHT, H. D., HEINE, G., JURGENS, M.,
17. M. Peptidomics: The comprehensive analysis of
local mixtures. *Combinatorial chemistry & high
throughput screening*, 2001. 4, s. 207-217.
18. DOMON, B., AEBERSOLD, R. Challenges and opportunities in proteomics
data analysis. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2006. 5, s. 1921-1926.
19. BAREA, J.L., ARIZA, J.L.G. Environmental proteomics and metallomics.
Proteomics, 2006. 6, s. 51-62.
20. MÁROVÁ, I., BREIEROVÁ, E., KOŤÍ, 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.
21. KOŤÍ, R., DRABKOVA M.; MÁROVÁ, I. Production of industrial
metabolites by red yeasts in stress conditions. *Chemicke Listy*, 2005. 99, s.
297-298.
22. MÁROVÁ, I.H., A.; L'ARNECKÁ, M. *Regulation of carotenoid production
in Rhodotorula glutinis by exogenous stress factors and by chemical
mutagenesis - a comparative study*, in *LSBMB*. 2006: Piešťany. S. 372.
23. KUSHNIROV, V.V. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*,
2000. 16, s. 857-860.
24. 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.
25. AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M., LAAKSO, S. Lipoxygenase from
Soybeans. *Methods in Enzymology*, 1981. 71(53), s. 441-451.
26. GROMOVA, I., CELIS, J.E. (2006) *Protein Detection in Gels by Silver
Staining: A Procedure Compatible with Mass-Spectrometry*. *Cell Biology: A
Laboratory Handbook*.
27. 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.
28. GARRELS, J.I. Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification
and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis*, 1997. 18, s. 1347-
1360.
29. VODRÁŽKA, Z., RAUCH, P., KÁČ, J. *Enzymologie 2*. Vol. 2. vydání:
VŠCHT Praha. 1991. ISBN 80-7080-124-7
30. LHOTSKÝ, A. *Pivovarská enzymologie*. Vol. 1. vydání: SNTL Praha. 1971.
31. 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



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

, REINIKAINEN, P., OLKKU, J., LAAKSO,
Malt Storage on Lipoxygenase Reaction. *Cereal*
2-746.

A. Odborné Plánky v medzinárodných časopisoch

1. MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; HALIENOVÁ, A.; KOČÍ, R.; BREIEROVÁ, E.: Production of carotenoid/ergosterol-supplemented biomass by red yeast *Rhodotorula glutinis* grown under external stress. *Food Technology and Biotechnology*, 2010, 48(1), p.56-61. ISSN: 1330-9862
2. MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; HALIENOVÁ, A.; DVOŘÁKOVÁ, T.; HÁRONIKOVÁ, A.: Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, 2010, Accepted for publication. ISSN: 0301-4797.
3. HALIENOVÁ, A.; MÁROVÁ, I.; ZDRÁHAL, Z.; KONEČNÁ, H.; ČARNECKÁ, M.; PAŘILOVÁ, K.; BREIEROVÁ, E.: Comparison of proteome and metabolome changes in stressed yeast strains *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula rubra*. *Chemické listy*, 2008. 102(15), p. 647-648. ISSN: 1213-7103.
4. HANUSOVÁ, V.; ČARNECKÁ, M.; HALIENOVÁ, A.; ČERTÍK, M.; BREIEROVÁ, E.; MÁROVÁ, I.: Physiological regulation of biotechnological production of carotenoid pigments. *Chemické listy*, 2008. 102 (S), p. 547-548. ISSN: 1213-7103.
5. 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), p. 615-616. ISSN: 1213-7103.
6. DUROŇOVÁ, K.; PAŘILOVÁ, K.; HALIENOVÁ, A.; FERDOVÁ, J.; KOČÍ, R.; GOLIÁŠ, J.; MÁROVÁ, I. Influence of long-term storage conditions on antioxidant and other active component content in several sorts of apples. *Chemické listy*, 2008, roč. 102, č. 15, s. 624-625. ISSN: 1213- 7103.
7. MÁROVÁ, I.; MIKULÍKOVÁ, R.; ZDRÁHAL, Z.; KONEČNÁ, H.; PAŘILOVÁ, K.; HALIENOVÁ, A. Characterization of Czech beer - a pilot study. *Chemické listy*, 2008, roč. 102, č. S, s. 274-275. ISSN: 1213- 7103.

- M.; HALIENOVÁ, A.; DVOŘÁKOVÁ, T.; BREIEROVÁ, E.: Production of carotenoid-enriched biomass by red yeast. In *Abstract book of the 21st International ICFMH Symposium Food Micro 2008, Aberdeen, UK 1. ř 9. 9. 2008*. p. 396-397.
2. HALIENOVÁ, A.; MÁROVÁ, I.; KONEČNÁ, H.; ČARNECKÁ, M.; PAŘILOVÁ, K.: 2D electrophoresis of proteome in stressed carotenogenic yeasts. In *Book of abstracts and abbreviated papers of 13th International Symposium on Separation Science and 13th Advances and Applications of Chromatography in Industry, High Tatras, Slovakia 27. 6. ř 29. 6. 2007*. File R03, p. 1 – 4, CD-ROM, ISBN 978-80-227-2698-6.
 3. HALIENOVÁ, A.; MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; HRDLÍČKOVÁ, J.; MACUCHOVÁ, S.; MIKULÍKOVÁ, R.: Use of experion microfluidic electrophoresis to analysis of proteins in various types of biological materials. In *Sborník přspěvků of XI. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, Czech Republic 31. 1. ř 1. 2. 2007*. p. 51 – 52. ISBN 978-80-210-4234-6.
 4. ČARNECKÁ, M.; HANUSOVÁ, V.; HALIENOVÁ, A.; HEZINOVÁ, V.; MÁROVÁ, I.: Difficulties of protoplast isolation and pulsed field gel electrophoresis analysis of DNA from red yeasts. In *Book of abstracts and abbreviated papers of 13th International Symposium on Separation Science and 13th Advances and Applications of Chromatography in Industry, High Tatras, Slovakia 27. 6. ř 29. 6. 2007*. File R04, p. 1 - 4, CD-ROM, ISBN 978-80-227-2698-6.

C. Prednášky

1. HALIENOVÁ, A.; MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; ZDRÁHAL, Z.; MÜLLER, L.; BREIEROVÁ, E.; ČERTÍK, M.: Proteomics and genomics of red yeasts: separation and partial identification of *Rhodotorula* proteins and DNA. In *Book of Abstracts of 37th Annual Conference on Yeasts; Smolenice, Slovakia 13. ř 15. 5. 2009*. p. 36. ISSN 1336-4839.

D. Abstrakty

1. DVOŘÁKOVÁ, T.; MÁROVÁ, I.; HALIENOVÁ, A.; MÜLLER, L.; ZDRÁHAL, Z.; ČARNECKÁ, M.: Genome and proteome analysis of red yeasts. In *Book of abstracts of 8th Balaton Symposium on High-Performance*

- SSS Symposium; Siofok, Hungary. 2. října 2009. 978-9985-59-930-3.
3. MÁROVÁ, I.; HALIENOVÁ, A.; ČARNECKÁ, M.; ZDRÁHAL, Z.: Proteome analysis in stressed red yeasts. In *Book of abstracts (CD-ROM) of 3rd Congress of European Microbiologists; Gotenburg, Sweden 28. 6. – 2. 7. 2009.* p. 2013.
 4. MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; HALIENOVÁ, A.; DVOŘÁKOVÁ, T.; HÁRONIKOVÁ, A. Use of several waste substrates for carotenoid- rich yeast biomass production. 3RD International Meeting of Environmental Biotechnology and Engineering. Španělsko: Govern de les Illes Balears, 2009. s. 152-152. ISBN: 978-84-692-4948- 2.
 5. HALIENOVÁ, A.; ČARNECKÁ, M.; MÁROVÁ, I.; BREIEROVÁ, E.: Production of beta-carotene and ergosterol by red yeast under physiological stress. In *Abstract book of The 21st International ICFMH Symposium Food Micro; Aberdeen, UK 1. – 9. 9. 2008.* p. 396.
 6. HALIENOVÁ, A.; MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; ZDRÁHAL, Z.; DVOŘÁKOVÁ, T.; BREIEROVÁ, E.: Proteomic and metabolomic analysis in salt- and peroxide-stressed yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula rubra*: a comparative study. In *Programme and abstracts of 36th Annual Conference on Yeasts; Smolenice, Slovakia 14. – 16. 5. 2008.* p. 51. ISBN 1336-4839.
 7. MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; HALIENOVÁ, A.; DVOŘÁKOVÁ, T.; HÁRONIKOVÁ, A.: Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. In *Book of abstracts of the 3rd International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering (3IMEBE); Palma de Mallorca, Spain 21. – 25. 9. 2008.* p. 317. ISBN 978-84-692-4948-2.
 8. MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; HALIENOVÁ, A.; KOČÍ, R.: Changes in red yeast cells during production of beta-carotene and ergosterol by physiological stress. In *FEBS Journal of 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference; Athens, Greece 28. 6. – 3. 7. 2008.* Number 275, Suppl. 1, p. 414.
 9. HANUSOVÁ, V.; ČARNECKÁ, M.; HALIENOVÁ, A.; ČERTÍK, M.; BREIEROVÁ, E.; MÁROVÁ, I.: Yeast carotenoid pigments – from screening to scale-up. In *Programme and abstracts of 36th Annual Conference on Yeasts; Smolenice, Slovakia 14. – 16. 5. 2008.* p. 26. ISBN 1336-4839
 10. DUROŇOVÁ, K.; FERDOVÁ, J.; HALIENOVÁ, A.; BAROŠOVÁ, M.; KOČÍ, R.; GOLIÁŠ, J.; MÁROVÁ, I. Changes of antioxidant status in apples during long-term storage under normal and modified atmosphere. In *Vitamins 2008 Nutrition and Diagnostics.* 2008. s. 126-127. ISBN: 978-80-7318-708- 8.



11. HALIENOVÁ, A.; FERDOVÁ, J.; KOČÍ, K.; ČARNECKÁ, M.: Influence of long-term storage conditions on component content in several sorts of apples. *4th Meeting on Chemistry and Life. Brno: CSCH, 2008. s. 2. 44 (2.44 s.)* ISBN: 978-80-214-3715-9.
12. HEZINOVÁ, V.; MÁROVÁ, I.; KLEPÁRNÍK, K.; ZDRÁHAL, Z.; ČARNECKÁ, M.; HALIENOVÁ, A.; FORET, F.: The comparative proteomic study of red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated under normal and stress condition. In *Book of abstracts of 3rd CECE; Brno, Czech Republic December 2008. p. 28.*
13. HALIENOVÁ, A.; MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; HANUSOVÁ, V.; HEZINOVÁ, V.: Proteome and metabolome changes in red yeasts grown under exogenous stress. In *Journal of Biotechnology. 2007, 131 (2), p. S202.* ISSN 0168-1656.
14. HALIENOVÁ, A.; MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; HANUSOVÁ, V.; HEZINOVÁ, V.: Changes of proteome and carotenoid production in stressed red yeasts. In *CELL STRESS & CHAPERONES. 2007, 131(2), p. 160.* ISSN 1355-8145.
15. HALIENOVÁ, A.; MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; KONEČNÁ, H.; HEZINOVÁ, V.; HANUSOVÁ, V.; ČERTÍK, M.: Proteome analysis in *Rhodotorula glutinis* cells grown under external stress conditions. In *Book of abstracts of 35th Annual Conference on Yeasts; Smolenice, Slovakia 16. - 18. 5. 2007. p. 89.* ISSN 1336-4839.
16. HALIENOVÁ, A.; MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; PAŘILOVÁ, K.: 2D electrophoresis of proteome in stressed carotenogenic yeasts. (R03). In *Book of abstracts and abbreviated papers of CEGSS; Bratislava 2007. p. 1-4.* ISBN: 978-80-227-2698-6.
17. HALIENOVÁ, A.; MÁROVÁ, I.; ČARNECKÁ, M.; HEZINOVÁ, V.; HANUSOVÁ, V.; ČERTÍK, M.: Proteome analysis in *Rhodotorula glutinis* grown under external stress conditions. In *Book of abstracts. 1. Bratislava: SAV, 2007. p. 89.* ISBN 978-80-210-4234-6.
18. ČARNECKÁ, M.; HALIENOVÁ, A.; HRDLÍČKOVÁ, J.; HEZINOVÁ, V.; MÁROVÁ, I.: Regulation of microbial production of carotenoids by some exogenous factors - a comparative study. In *Book of abstracts of 1. CZ; Brno, Czech republic, 2007. p. 44.* ISBN: 978-80-210-4234-6.
19. MÁROVÁ, I.; HALIENOVÁ, A.; PAŘILOVÁ, K.; ČEŠKOVÁ, I. Isolation and 1D microfluidic electrophoresis in selected microbial, plant and animal samples - a comparative study. In *Book of abstracts and abbreviated papers. 1. Bratislava: CEGSS, 2007. s. 1-4.* ISBN: 978-80-227-2698-6.
20. ČARNECKÁ, M.; HALIENOVÁ, A.; HRDLÍČKOVÁ, J.; HEZINOVÁ, V.; MÁROVÁ, I.: Regulation of microbial production of carotenoids by some exogenous factors – a comparative study. In *Sborník příspěvků of XI. Pracovní*



- árních biologů, Brno, Czech Republic 31. 1. 2007. s. 210-4234-6.
- MÁROVÁ, I.: Difficulties of protoplast isolation and pulsed field gel electrophoresis analysis of DNA from red yeasts (R04). In *Book of abstracts and abbreviated papers of CEGSS; Bratislava 2007*. p. 1-4. ISBN 978-80-227-2698-6.
22. MÁROVÁ, I.; MACUCHOVÁ, S.; ČEŠKOVÁ, I.; HALIENOVÁ, A. *Analysis of seasonal changes of antioxidants and other active substances in breast milk in a sample of Czech population*. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. s. 286-286.
23. ČARNECKÁ, M.; HANUSOVÁ, V.; HEZINOVÁ, V.; HALIENOVÁ, A.; BREIEROVÁ, E.; ČERTÍK, M.; MÁROVÁ, I.: Preparation of protoplasts from several carotenogenic yeasts: a comparative study. In *Book of abstracts of 35th Annual Conference on Yeasts; Smolenice, Slovakia 16. 5. 2007*. p. 90. ISSN 1336-4839.
24. ČARNECKÁ, M.; HANUSOVÁ, V.; HEZINOVÁ, V.; HALIENOVÁ, A.; BREIEROVÁ, E.; ČERTÍK, M.; MÁROVÁ, I.: Preparation of protoplasts from several carotenogenic yeasts : a comparative study. In *Book of abstracts*. 1. Bratislava: SAV, 2007. p. 90. ISBN 978-80-210-4234-6.
25. MÁROVÁ, I.; HALIENOVÁ, A.; ČARNECKÁ, M.; DRÁBKOVÁ, M.; KUBEŠOVÁ, J.: Influence of chemical mutagens and exogenous stress factors on microbial production of carotenoids – a comparative study. In *Book of abstracts of 20th International ICFMH Symposium Food Micro 2006; Bologna, Italy 29. 8. 2006*. p. 104.
26. MÁROVÁ, I.; HALIENOVÁ, A.; ČARNECKÁ, M.; DRÁBKOVÁ, M.; KUBEŠOVÁ, J.: Regulation of carotenoid production in *Rhodotorula glutinis* by exogenous stress factors and by chemical mutagenesis – a comparative study. In *Book of abstracts of XX. Biochemický zjazd; Piešťany, Slovakia 12. 9. 2006*. p. 372. ISBN 80-969532-6-5.
27. MÁROVÁ, I.; HALIENOVÁ, A.; MACUCHOVÁ, S.; MIKULÍKOVÁ, R. Use of microfluidic electrophoresis to the analysis of proteins in various types of biological materials: a comparison with gel and gel-free techniques. In *Book of Abstracts. Nezasazené Plánky*. Lipica; Slovenia: Universita Ljubljana, 2006. s. 45-46.
28. HRDLÍČKOVÁ, J.; MÁROVÁ, I.; HALIENOVÁ, A.; ČARNECKÁ, M.; DRÁBKOVÁ, M.: Analysis of protein profile changes in subcellular fractions of carotenogenic yeasts. In *Book of abstracts of 20th International ICFMH Symposium Food Micro 2006; Bologna, Italy 29. 8. 2006*. p. 80.
29. DRÁBKOVÁ, M.; MÁROVÁ, I.; KUBEŠOVÁ, J.; HALIENOVÁ, A.; ČARNECKÁ, M.; KOČÍ, R.: Isolation and characterization of some subcellular fractions of stressed red yeasts. In *Book of abstracts of 34th Annual Conference on Yeasts; Smolenice, Slovakia 10. 5. 2006*. p. 83. ISSN 1336-4839.