



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STUDIUM ŘÍZENÍ METABOLISMU KAROTENOGENNÍCH  
KVASINEK NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI**

CONTROL OF METABOLISM OF CAROTENOGENIC YEASTS ON MOLECULAR LEVEL

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Zuzana Pokrývková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

**BRNO 2017**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1058/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Zuzana Pokrývková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Studium řízení metabolismu karotenogenních kvasinek na molekulární úrovni

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Rešerše zaměřená na metabolismus lipotvorných a karotenogenních kvasinek
2. Screening vybraných karotenogenních kvasinek – produkce biomasy a metabolitů na různých substrátech
3. Charakterizace genomu a vybraných genů kvasinek
4. Vliv UV mutageneze na metabolickou aktivitu a genom kvasinek

### Termín odevzdání diplomové práce: 19.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Zuzana Pokrývková  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

POKRÝVKOVÁ, Z. *Studium řízení metabolismu karotenogenních kvasinek na molekulární úrovni*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 70 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

#### PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

podpis študenta

Týmto by som chcela úprimne poďakovať svojej vedúcej diplomovej práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za jej odborné rady a Ing. Ivete Kostovovej za pomoc a veľkú ochotu pri vypracovávaní experimentálnej časti a celej mojej rodine a priateľovi Janovi Kubíkovi za veľkú podporu.

## ABSTRAKT

Predložená diplomová práca sa zaoberala molekulárnou charakterizáciou karotenogénnych kvasiniek. Použitými technikami pre analýzu konzervovaných úsekov rDNA D1/D2 oblasti veľkej ribozomálnej podjednotky 26S oblasti a ITS1 a 5,8-ITS2 oblastí boli „nested PCR“ a denaturačná gradientová elektroforéza DGGE. Z výsledkov DGGE vyplýva, že všetky analyzované kmene karotenogénnych kvasiniek majú veľmi podobnú sekvenciu týchto oblastí, kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* so zbierkovým číslom CCY 20-7-28 preukazovala odlišnosti od ostatných kmeňov karotenogénnych kvasiniek.

Pre doplnenie molekulárnej charakterizácie pomocou sekvencie ribozomálnych génov bola prevedená taktiež fenotypová charakterizácia celkom ôsmich kmeňov karotenogénnych kvasiniek. K tomuto účelu boli prevedené utilizačné testy na rôznych substrátoch a ďalej rastové a produkčné charakteristiky jednotlivých kmeňov.

Cieľom práce bolo taktiež pripraviť taký kmeň karotenogénnej kvasinky, ktorý sa vyznačuje nadprodukciou metabolitov, najmä karotenoidov a lipidov, a to pomocou náhodnej mutácie spôsobenej UV žiarením. Ako vhodný kandidát bol vybraný kmeň *C. capitatum* CCY 10-1-2 na základe predchádzajúcich štúdií, kde sa preukázal ako dobrý producent TAG na odpadnom glycerole. Tento kmeň bol následne adaptovaný na odpadovú srvátku, glycerol a glukózu ako jednoduchý zdroj uhlíku.

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

Karotenogénne kvasinky, DGGE, PCR, molekulárna charakterizácia, mutagenéza, odpadové substráty

## ABSTRACT

This diploma thesis deals with the molecular characterization of carotenogenic yeasts. The techniques used for the analysis of the conserved regions of the D1/D2 rDNA region of the 26S ribosomal large subunit region and the ITS1 and 5,8-ITS2 regions were nested PCR and DGGE. The results of DGGE show that all analyzed yeast strains have very similar sequences of these regions. The yeast *Rhodotorula mucilaginosa* with the collection number CCY 20-7-28 showed differences from the other carotenogenic yeast strains.

As a part of molecular characterisation using ribosomal gene sequences, eight yeast strains were examined for substrate utilisation tests using different substrates. Characterisation of growth and metabolite production was tested in each strain too.

The next aim of this thesis was to prepare a carotenoid yeast strain characterized by overproduction of metabolites, in particular carotenoids and lipids. Yeasts were subjected to a random mutation caused by UV irradiation and the influence of this mutagen on the production of metabolites was evaluated. As a candidate yeast strain *C. capitatum* CCY 10-1-2 was selected. This selection was based on previous studies due to its good production of lipids using waste glycerol as a substrate. This strain was subsequently adapted to waste whey, glycerol, and a glucose as a basic carbon source.

## KEYWORDS

Carotenoid yeast, DGGE, PCR, molecular characterization, mutagenesis, waste substrates

|   |    |
|---|----|
| ABSTRAKT .....  | 4  |
| ABSTRACT .....  | 4  |
| 1 ÚVOD.....   | 7  |
| 2 TEORETICKÁ ČASŤ .....   | 8  |
| 2.1 Taxonómia.....  | 8  |
| 2.2 Karotenogénne kvasinky a ich taxonómia .....                                      | 8  |
| 2.2.1 Rod <i>Rhodotorula</i> .....  | 9  |
| 2.2.2 Rod <i>Cystofilobasidium</i> .....  | 9  |
| 2.2.3 Rod <i>Phaffia</i> .....  | 10 |
| 2.3 Významné metabolity karotenogénnych kvasiniek .....                               | 10 |
| 2.3.1 Karotenoidy.....  | 11 |
| 2.3.1.1 Biosyntéza karotenoidov .....   | 11 |
| 2.3.2 Lipidy .....  | 11 |
| 2.3.2.1 Metabolizmus lipidov.....   | 12 |
| 2.3.2.2 Akumulácia lipidov .....  | 13 |
| 2.4 Mutagenéza .....  | 13 |
| 2.4.1 Typy mutácií .....  | 14 |
| 2.4.2 Mutagény používané v mikrobiológii .....  | 14 |
| 2.5 Odpadné substráty .....   | 14 |
| 2.5.1 Glycerol.....   | 15 |
| 2.5.2 Srvátka .....   | 15 |
| 2.6 Spôsoby extrakcie významných metabolitov kvasiniek .....                          | 15 |
| 2.7 Analýza vybraných metabolitov kvasiniek .....                                     | 16 |
| 2.7.1 Chromatografické metódy .....   | 16 |
| 2.7.1.1 RP-HPLC/PDA .....   | 16 |
| 2.8 Metódy molekulárnej identifikácie a charakterizácie kvasiniek .....               | 17 |
| 2.9 Ribozomálne gény sekvencie ITS1,2 D1/D2 .....                                     | 17 |
| 2.9.1 Izolácia DNA .....  | 18 |
| 2.9.2 Polymerázová reťazová reakcia .....   | 19 |
| 2.9.3 Denaturačná gélová gradientová elektroforéza (DGGE).....                        | 20 |
| 2.9.4 Sekvenovanie .....  | 21 |
| 2.10 Prietoková cytometria .....  | 21 |
| 3 CIEĽ PRÁCE .....  | 23 |
| 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....  | 24 |
| 4.1 Mikrobiálne kmene, chemikálie a prístrojové vybavenie .....                       | 24 |
| 4.2 Použité chemikálie .....  | 24 |
| 4.2.1 Kultivácia .....  | 24 |
| 4.1.1 Izolácia DNA, elektroforéza, DGGE .....   | 24 |
| 4.2.2 Prístroje a pomôcky .....   | 25 |
| 4.2.3 Použité kvasinkové kmene.....   | 26 |
| 4.3 Molekulárne metódy .....  | 26 |
| 4.3.1 Izolácia kvasinkovej DNA .....  | 26 |
| 4.3.2 Precipitácia DNA .....  | 27 |
| 4.3.3 Optimalizácia PCR.....  | 27 |
| 4.3.4 Molekulárna charakterizácia štandardných kmeňov karotenogénnych kvasiniek ..... | 27 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.3.5   | Kontrola PCR produktov horizontálnou elektroforézou.....            | 28 |
| 4.3.6   | Analýza špecifickej časti kvasinkovej DNA pomocou DGGE.....         | 29 |
| 4.3.7   | Sekvenovanie .....  | 30 |
| 4.4     | Kultivačné metódy .....   | 30 |
| 4.4.1   | Selekčné testy.....   | 30 |
| 4.4.2   | Kultivácia karotenogénnych kmeňov kvasiniek .....                   | 31 |
| 4.4.3   | Zloženie kultivačných médií.....                                    | 31 |
| 4.4.4   | Mikroskopické pozorovanie buniek.....                               | 32 |
| 4.4.5   | Stanovenie biomasy .....  | 32 |
| 4.4.6   | Spracovanie biomasy .....   | 33 |
| 4.4.7   | Stanovenie glukózy .....  | 33 |
| 4.4.7.1 | Príprava činidiel .....   | 33 |
| 4.4.7.2 | Stanovenie kalibračnej krivky glukózy .....                         | 33 |
| 4.4.8   | Izolácia a analýza karotenoidov a vybraných lipidických látok ..... | 34 |
| 4.4.8.1 | Extrakcia karotenoidov a lipidických látok z kvasiniek.....         | 34 |
| 4.4.8.2 | Analýza karotenoidov metódou RP-HPLC/PDA .....                      | 34 |
| 4.4.8.3 | Enzymatické stanovenie lipidov.....                                 | 35 |
| 4.5     | Kultivácia mutantných kmeňov .....                                  | 35 |
| 4.5.1   | Analýza mutantných kmeňov karotenogénnych kvasiniek.....            | 36 |
| 4.6     | Použitie prietokovej cytometrie .....                               | 37 |
| 5       | VÝSLEDKY A DISKUSIA .....   | 38 |
| 5.1     | Molekulárna časť .....  | 38 |
| 5.1.1   | Izolácia DNA, PCR a gélová elektroforéza .....                      | 38 |
| 5.1.2   | DGGE .....  | 39 |
| 5.1.3   | Sekvenovanie oblasti ITS1-5,8S-ITS2 a D1/D2 .....                   | 39 |
| 5.2     | Fenotypová charakterizácia.....                                     | 41 |
| 5.2.1   | Selekčné testy.....   | 41 |
| 5.2.2   | Kultivácia .....  | 44 |
| 5.2.2.1 | Rastové charakteristiky .....                                       | 44 |
| 5.2.2.2 | Sledovanie morfológických zmien.....                                | 48 |
| 5.2.2.3 | Stanovenie metabolitov .....  | 50 |
| 5.3     | Mutagenéza .....  | 52 |
| 5.3.1   | Využitie prietokovej cytometrie k analýze mutantných kmeňov .....   | 52 |
| 5.3.2   | Kultivácia mutantných kmeňov .....                                  | 57 |
| 5.3.2.1 | Stanovenie metabolitov .....  | 57 |
| 5.3.3   | Stabilita genómu mutantných kmeňov sledovaná pomocou DGGE.....      | 62 |
| 6       | Záver.....  | 63 |
| 8       | BIBLIOGRAFIE .....  | 65 |
|         | ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV .....                          | 70 |

# 1 ÚVOD

Molekulárne metódy identifikácie kvasiniek sú dnes neoddeliteľnou súčasťou identifikácie a fylogenetického a taxonomického zaradenia kvasiniek. Ich hlavnými výhodami je, že sú veľmi rýchle v porovnaní s metódami tradičnej mikrobiológie. Metody tradičnej mikrobiológie rozlišujú mikroorganizmy na základe ich morfológických a fyziologických vlastností, sú ovplyvnené podmienkami vonkajšieho prostredia a vyžadujú radu kultivačných testov, akými sú hodnotenie vzhľadu a tvaru kolónií, sporulácia a morfológia buniek, testy schopnosti kvasiť cukry, ďalej rôzne nároky kvasiniek na teplotu prostredia, koncentráciu cukrov a solí.

Hlavnou výhodou molekulárnych metód je, že nie sú závislé na podmienkach okolitého prostredia. Molekulárne metódy sú založené na rozdielnosti DNA sekvencií medzi jednotlivými kvasinkovými druhmi. K tomu, aby bolo možné porovnať sekvencie jednotlivých génov, je u týchto metód dôležité najprv izolovať jadrovú DNA daného druhu a pomocou metódy polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) amplifikovať požadovaný úsek DNA. Medzidruhovo variabilné a pritom konzervované sekvencie pre presné určenie pôvodu mikroorganizmu sú oblasti D1/D2 rDNA, čo sú oblasti kódujúce veľkú ribozomálnu podjednotku, ďalej oblasti ITS1 a 5.8 ITS2. Sekvencie týchto oblastí môžu byť separované v denaturačnom gradiente metódou DGGE. Táto metóda umožňuje rozlíšiť rozdiely v sekvenciách DNA a preto je vhodná ako metóda “fingerprintu” pre identifikáciu jednotlivých druhov mikroorganizmov. Jej nevýhodou je, že je možné ju aplikovať iba pre sekvencie do veľkosti 500 bp.

Predložená diplomová práca sa zaoberá molekulárnou charakterizáciou karotenogénnych kvasiniek. Taktiež sa sledovalo využitie niektorých typov odpadných substrátov ako nutričných zdrojov k produkcii kvasinkových metabolitov. Bol zisťovaný vplyv náhodných mutácií spôsobených UV žiarením na produkciu karotenoidov a lipidických látok. V dnešnej dobe je možné pripraviť mutanty, ktoré sú z priemyselného hľadiska výhodnejšie ako pôvodné kmene. Dochádza k zlepšeniu rady vlastností, pri oslabení vlastností druhých. Pri mutáciách je dôležitý čas pôsobenia mutagénu. Najlepším spôsobom je použitie takého mutagénu, pri ktorom je nízka úmrtnosť mikroorganizmu, ale vysoká frekvencia mutácie. Vybranými karotenogénnymi kvasinkami boli *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium macerans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* a *Phaffia rhododyma*.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Taxonómia

Taxonómia je vedný obor, ktorý sa týka klasifikácie, teda charakterizácie a následného usporiadania taxónov na základe danej klasifikačnej schémy. Vzhľadom k používaniu stále nových a nových technológií ide o obor, ktorý sa neustále vyvíja. Pôvodný taxonomický systém bol založený výhradne na fenotypových vlastnostiach jednotlivých kmeňov a na spôsobe rozmnožovania, teda či sa rozmnožujú pohlavným alebo nepohlavným spôsobom.

Genotypové metódy sa predtým zameriavali na stanovenie percentuálneho pomeru guaninových a cytozinových bází, tie sú však už nedostačujúce. Dnes sú používané predovšetkým molekulárne metódy založené na porovnávaní sekvencií ribozomálnych génov, a to najmä ITS sekvencií (Internal Transcribed Spacer Regions - interné prepisované medzerníkové oblasti) a D1/D2 sekvencie náležiacie sekvencií génu pre veľkú ribozomálnu podjednotku. Ďalšou molekulárne typizačnou metódou je pulzná gélová elektroforéza, slúžiaca ku štúdiu karyotypu jednotlivých kvasinkových kmeňov.

Fyziologické vlastnosti dnes slúžia pre charakterizáciu fenotypových vlastností kvasiniek. Používajú sa taktiež testy využitia substrátu, fermentačné testy, testy na základe asimilácie rôznych uhlíkatých a dusíkatých zdrojov, požiadavky na vitamíny, osmotický tlak či na rôznu teplotu. Pre presnú identifikáciu kvasiniek na úrovni druhu sú dnes používané hlavne sekvencie ribozomálnych génov a u veľmi príbuzných druhov môže byť identifikácia doplnená o porovnávanie sekvencií génov pre časť génu RNA polymerázy II kodujúcu dve podjednotky (*RPB1* a *RPB2*), translačný elongačný faktor 1- $\alpha$  (*TEF-1*) a mitochondriálny gén cytochróm *b* (*CYTB*). Získané sekvencie sú porovnávané pomocou služby BLAST s databázou NCBI. V roku 2011 bolo na medzinárodnom botanickom kongrese v Melbourne ustanovené pravidlo tzv. „one fungus = one name“ (jedna huba = jedno meno). Tento krok má za úlohu vytvorenie monofyletických taxónov v taxonómii hub tak, aby moderná taxonómia odpovedala monofyletickým vzťahom medzi jednotlivými druhmi [1] [2] [3].

### 2.2 Karotenogénne kvasinky a ich taxonómia

Väčšina týchto kvasiniek sa vyskytuje po celom svete od Európy, cez Ameriku až po Áziu. Vo väčšine prípadov sú parazitami rastlín, možno ich nájsť v morskej vode alebo napríklad na koži ľudí. Majú striktno aeróbnny metabolizmus a väčšinou nemajú schopnosť kvasiť cukry na etanol a oxid uhličitý. Vyznačujú sa produkciou karotenoidných pigmentov, ktoré im udeľujú ich oranžové, ružové až červené zafarbenie. Nejviac akumulované karotenoidy sú  $\beta$ -karotén,  $\alpha$  karotén, torulén, torularhodin a lykopén. Mnoho týchto kmeňov akumuluje koenzým Q9 alebo koenzým Q10. Vegetatívne sa rozmnožujú pučaním, ktoré môže byť multilaterálne alebo polárne. Niektoré druhy môžu vytvárať pseudomycélia až pravé mycélia [1] [4] [5].

Tieto kvasinky majú veľký potenciál, ktorý spočíva v ich schopnosti akumulovať až 60 % lipidov bez nutnosti akejkoľvek genetickej modifikácie. V porovnaní s ostatnými lipidotvornými kvasinkami, ktoré prirodzene dokážu akumulovať najviac okolo 30 % lipidov, sú považované za najviac sľubné producenty biodieselu budúcnosti [1] [4] [5].

Karotenogénne kvasinky tvoria skupinu kvasinkových organismov náležiacich do kmeňa *Basidiomycota*. Medzi najvýznamnejších zástupcov karotenogénnych kvasiniek sa radia rody *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium* a *Phaffia*, kde rody *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* sú radené do podkmeňa *Pucciniomycotina* a rody *Cystofilobasidium* a *Phaffia* náležia do podkmeňa *Agaricomycotina* vid' Obr.1 .



|              |                     |                     |  |                        |                      |
|--------------|---------------------|---------------------|--|------------------------|----------------------|
| Oddelenie    | Basidiomycota       |                     |  |                        |                      |
| Pododdelenie | Agaricomycotina     |                     |  | Pucciniomycotina       |                      |
| Rad          |                     | Cystofilobasidiales |  | Sporidiobolales        | Cystobasidiomycetes  |
| Rod          | Phaffia             |                     | Cystofilobasidium  | Rhodotorula            | Bukleyzyma           |
| Druh         | <i>P. rhodozyma</i> |                     | <i>C. capitatum</i><br><i>C. macerans</i><br><i>C. infirmominiatum</i> | <i>R. mucilaginosa</i> | <i>B. aurantiaca</i> |

Obr.1. Aktuálne rozdelenie taxonómie karotenogénnych kvasiniek [1] [2]

### 2.2.1 Rod *Rhodotorula*

Najznámejšie a najpoužívanéjšie druhy rodu *Rhodotorula* sú: *R. glutinis*, *R. toruloides* a *R. mucilaginosa*. Sú to ubikvitné kvasinky, čo znamená, že môžu žiť kdekoľvek a za akýchkoľvek podmienok. Najviac sa vyskytujú voľne v prírode, vo vzduchu, v pôde, vo vode i na organických látkach. Sú nenáročné na životné podmienky. Sú tolerantné voči vysokému osmotickému tlaku i kyslému prostrediu, nie sú však odolné voči vysokým teplotám. Sú lipidotvorné, hromadia v bunkách tuk. Neskvasujú žiadne cukry, ale majú vyvinutý pentózový cyklus využívania glukózy. Bunky sú guľaté, oválne, prípadne pretiahnuté. Nevytvárajú spóry a rovnako netvorí ani pseudomycélium. Kolónie na agare majú širokú škálu farieb v závislosti na zložení živnej pôdy od lososovej až po korálovo červenú v dôsledku produkcie karotenoidných farbív. Na svoj vznik potrebujú najmä svetlo a kyslík, tma pôsobí na vznik karotenoidov inhibične. Povrch je hladký, lesklý, slizovitý, okraj kolónií je ucelený [6] [7].



Obr.2. Náter rodu *Rhodotorula*

### 2.2.2 Rod *Cystofilobasidium*

V súčasnosti sa do tohto rodu zaraďujú štyri druhy- *C. capitatum*, *C. bisporidii*, *C. ferigula* a *C. infirmominiatum*. Kolónie sú charakteristické lesklým a hladkým povrchom. Bunky majú guľatý až pretiahnutý tvar. V kvapalnom prostredí tvoria tenkú kožku a sediment. Všetky druhy obsahujú vo svojej bunkovej stene xylózu a majú schopnosť produkovať látky podobné škrobu a taktiež utilizovať glukuronát. Nemajú schopnosť kvasiť glukózu a majú prísne aerobný metabolizmus. *Cystofilobasidium capitatum* sa vyznačuje vysokou produkciou  $\beta$ -karotenu, torulenu a torularhodinu a koenzýmu Q-10 [8] [1] [9].



Obr.3. Náter rodu *Cystofilibasidium* [10]

### 2.2.3 Rod *Phaffia*

Táto červená kvasinka sa vyznačuje okrem produkcie beta karoténu aj veľkou produkciou astaxanthínu. Ten sa akumuluje v kvapkách lipidov cytoplazmatickej membrány a slúži ako ochrana proti voľným radikálom. Produkujú koenzým Q-10 a ich bunky obsahujú xylulózu. Kolónie sú pomarančovočervené a hladké. Tvar bunky je elipsoidný, bunky môžu byť buď jednotlivito, v pároch alebo v krátkych retiazkách. V kvapaline sedimentujú, tvoria prstenec i kožku. Rozmnožujú sa pučaním. Ako jedna z mála červených kvasiniek dokáže skvasovať cukry [8] [1] [11].



Obr.4. Náter rodu *Phaffia* [12]

## 2.3 Významné metabolity karotenogénnych kvasiniek

Medzi významné metabolity karotenogénnych kvasiniek patria karotenoidy a lipidy. Karotenoidy sú lipofilné žlté, oranžové až červené pigmenty, zastúpené vo všetkých typoch živých organizmoch. Plnia rôzne funkcie. Maximum absorpcie svetelného žiarenia sa pohybuje v rozmedzí 400 až 500 nm, pričom absorpčné maximum derivátov závisí na polohe dvojitých väzieb na konci molekúl. Nachádzajú sa vo vnútri membrán buniek, pretože veľmi ťažko difundujú do vnútorného prostredia buniek. Vďaka väčšiemu počtu dvojitých väzieb sú karotenoidy odolné voči zmene pH, či pôsobeniu redukčných činidiel, sú však citlivé na oxidáciu. Táto vlastnosť umožňuje karotenoidom zhasať singletový kyslík, zachytávať

voľné radikály a tým inhibovať peroxidáciu či oxidáciu, čím z nich robí významné antioxidanty. Pri vystavení účinkom intenzívnejšieho svetelného žiarenia sa rozkladajú.

U baktérií majú ochrannú funkciu bunkovej steny, v rastlinách majú význam vo fotosyntéze ako fotoprotektory. Sú taktiež prekurzormi rastlinných hormónov, u ľudí a zvierat sú prekurzormi vitamínu A. Sú rozpustné v nepolárnych rozpúšťadlách. Používajú sa k farbeniu potravín, napríklad zmrzlín či džúsov. Pridávajú sa do krmiva dojníc a hydiny pre zaistenie žiadúcej pigmentácie vajec, mäsa, mlieka a výrobkov z neho [13] [14] [15] [16] [17].

### 2.3.1 Karotenoidy

Z chemického hľadiska sú to nenasýtené uhl'ovodíky alebo kyslíkové deriváty týchto uhl'ovodíkov zo skupiny tetraterpénov. Sú to produkty sekundárneho metabolizmu rastlín a niektorých mikroorganizmov a vychádzajú z izoprénovej dráhy. Molekuly väčšiny karotenoidov sú tvorené 40 atómami uhlíka s metylovým vetvením. Sú vybudované z ôsmich izoprénových jednotiek. Čisté uhl'ovodíky nazývame karotény a ich najvýznamnejší zástupcovia sú lykopén, karotény a fytoén. Delíme ich na dve hlavné skupiny a to anoxygénne a oxygénne. Väčšina prírodných karotenoidov sú oxidačné produkty anoxygénnych karoténov. Na základe vytvárania cyklickej alebo acyklickej deväťčlennej jednotky na konci reťazca (alebo oboch koncoch) delíme karotenoidy na acyklické, monocyklické a bicyklické [13].

#### 2.3.1.1 Biosyntéza karotenoidov

Biosyntéza vychádza zo spoločnej dráhy biosyntézy izoprenoidov. Východnou látkou pre biosyntézu izoprenoidov je acetyl-CoA. Prvým krokom syntézy karotenoidov je reakcia acetyl-CoA s medziproduktom biosyntézy mastných kyselín acetoacetyl-CoA na 3-hydroxy-3-metyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) pomocou HMG-CoA syntetázy. Redukciou vzniká kyselina mevalonová (MVA), ktorá je prvým prekurzorom terpenoidnej biosyntetickej dráhy. MVA je fosforylovaná pomocou MVA kinázy a dekarboxylovaná až na izopentyl pyrofosfát (IPP, tzv. aktívny izoprén). Ten enzýmovou katalýzou prejde na dimethylallyldifosfát. Kondenzáciou dvoch posledných medziproduktov vzniká geranyldifosfát. V aktívnej fáze rozmnožovania kvasiniek sa tvoria prevažne bezfarebné karotenoidné polyény – fytoén a fytofluén. Ten následne podlieha desaturácii za tvorby lykopénu a z neho  $\beta$ -karotén, čo sú už farebné pigmenty [13].

### 2.3.2 Lipidy

Lipidy plnia mnoho dôležitých funkcií. Sú zásobárňou energie a tvoria tepelnú izoláciu. Sú nepolárneho charakteru, rozpustné v nepolárnych organických rozpúšťadlách. Z chemického hľadiska sú to estery alkoholov a vyšších mastných kyselín. Delia sa na jednoduché alebo zložené. Zložené majú jednu z esterových väzieb esterifikovanú inou kyselinou (napr. fosforečnou), prípadne obsahujú aj iné viazané zložky, akými sú sacharidy či alkoholy a sú hlavnou zložkou biomembrán. Jednoduché sa delia na acylglyceroly a vosky, čo sú estery vyšších mastných kyselín a vyšších alkoholov.

Lipidy z prírodných substrátov produkované mikrobiálne sa nazývajú single-cell oil (SCO) a sú produkované pomocou tzv. oleogénnych mikroorganizmov. SCO sú zložené predovšetkým z triacylglycerolov (TAG) a sterylsterolov. Ich význam spočíva obsahu dôležitých polynenasýtených mastných kyselín (PUFA), medzi ktoré sa radí napr. kyselina linolénová, arachidonová a iné.

Pomocou transesterifikačných reakcií je možné pripraviť z olejov bionaftu, ktorá sa skladá z esterov mastných kyselín. Mnoho kvasinkových druhov bolo označených ako oleogénne mikroorganizmy, pretože dokážu tvoriť a akumulovať za vhodných podmienok viac ako 20% TAG na sušinu biomasy. Bolo preukázané, že pri limitácii dusíku u oleogénnych mikroorganizmov dochádza ku zvýšenej akumulácii TAG v intracelulárnych lipidových organelách, na rozdiel od iných mikroorganizmov, pri ktorých limitácia dusíka znamená prevod prebytku uhlíka na zásobné polysacharidy [14] [15] [16] [17].

### 2.3.2.1 Metabolizmus lipidov

V priebehu syntézy mastnej kyseliny (ďalej MK) dochádza k postupnej kondenzácii dvojuhlíkových zbytkov, z ktorých sa zostaví celý reťazec MK. Konečným produktom je vždy palmitát. Syntéza MK je lokalizovaná v cytosole.

Prvým krokom je transport acetyl-CoA. Acetyl-CoA vnútornou membránou mitochondrií neprechádza a neexistuje pre neho ani špecifický prenášač. Musí sa teda premeniť na látku, ktorá prenášač má. Acetyl-CoA reaguje s oxalacetátom za katalýzy citrát-syntázy a vzniká citrát. Citrát je prenesený do cytosolu pomocou trikarboxylátového transportéru. Následne je rozštiepený za prítomnosti CoA a ATP za katalýzy ATP-citrátlyázy na acetyl-CoA a oxalacetát. Vzniknutý oxalacetát môže byť pomocou cytosolickej malátdehydrogenázy premenený na malát, ktorý sa môže vrátiť do matrix mitochondrií alebo môže vstupovať do ďalšej reakcie. V tej je premenený na pyruvát pomocou NADP<sup>+</sup>-dependentnej redukujúcej malátdehydrogenázy (jablčného enzýmu). Vzniknuté redukčné ekvivalenty NADPH môžu byť využité pre syntézu MK. Acetyl-CoA v cytosole je premenený na malonyl-CoA. Táto reakcia je katalyzovaná acetyl-CoA-karboxylázou a na jej priebeh je potreba ATP a biotín ako kofaktor. Táto reakcia je dôležitým regulačným krokom celej syntézy MK.

Všetky ďalšie reakcie sú katalyzované multifunkčným enzýmom- syntáza mastných kyselín FAS (Fatty acid synthase). Syntháza mastných kyselín (monomér) obsahuje dve miesta kam sa substráty môžu viazať a to ACP s voľnou -SH väzbou z 4'-fosfopantotheínu a voľnou -SH skupinu cysteínu z proteínového reťazca. Dochádza k väzbe acetyl-CoA na ACP pomocou enzýmu acetyltransacyláza. Nasleduje presun acetylového zvyšku z ACP na voľnú -SH skupinu cysteínu. SH skupina ACP sa tak uvoľní pre väzbu malonyl-CoA, ktorého zvyšok sa viaže na syntházu MK za katalýzy malonyltransacylázy. Nasleduje kondenzácia medzi týmito zvyškami. Reakcia je katalyzovaná enzýmom ketoacylsyntháza. Dochádza k uvoľneniu oxidu uhličitého a vzniku acetoacetylu, ktorý ostáva naviazaný na ACP syntházy MK. Naviazaný acetoacetyl je zredukovaný pomocou ketoacylreduktázy a NADPH+H<sup>+</sup> na 3-hydroxybutyryl, stále viazaný na ACP. Nasleduje dehydratácia, vzniká dvojité väzba. Reakcia je katalyzovaná enzýmom hydroxyacyldehydratázou. V poslednom kroku dochádza k redukcii dvojitej väzby pomocou NADPH+H<sup>+</sup> a enzýmovej aktivity enoylreduktázy a vzniká butyrylový zbytok viazaný na ACP. Cyklus sa dokončí tým, že produkt predchádzajúcej reakcie sa presunie z ACP na cysteín a uvoľní tým miesto pre väzbu ďalšieho substrátu, a to pre malonyl-CoA. Cyklus sa opakuje ešte šesťkrát a výsledným produktom je palmitát viazaný na ACP. Ten sa pomocou thiolázy odštiepi a uvoľní vo forme palmitátu, ktorý vstupuje do ďalších reakcií.

Posledný krokom syntézy lipidov je esterifikácia glycerolu s mastnými kyselinami za pôsobenia acyltransferáz. Aktivované formy glycerolu sú získané najmä z glykolýzy. Prvou esterifikačnou reakciou vzniká lyzofosfatidová kyselina, ďalšou esterifikáciou vzniká

fosfatidová kyselina. Tá je využívaná pre syntézu zložených lipidov alebo štiepená pomocou fosfatázy za vzniku diacylglycerolu. Finálnou esterifikáciou diacylglycerolu vzniká triacylglycerol [15] [18] [19].

### 2.3.2.2 Akumulácia lipidov

Biosyntézu triacylglycerolov (TAG) pomocou mikroorganizmov možno rozdeliť na *de novo* a *ex novo* akumuláciu. Pre akumuláciu lipidov v mikroorganizme je dôležité, aby v médiu bol vyčerpaný dusík. O *de novo* akumuláciu sa jedná vtedy, keď sú v médiu zdrojom uhlíku cukry (najčastejšie glukóza). Pri nedostatku dusíku je uhlík prevedený na triacylglyceroly. Táto premena sa deje aj za prítomnosti dusíku, ale jeho neprítomnosť neumožňuje bunkám nadmerné množenie a lipidy sa tak ukladajú a hromadia vo vnútri buniek. Zodpovedné enzýmy sú ATP citrátlyáza a malátový enzým. ATP citrátlyza je zodpovedná za tvorbu cytoplasmatického acetyl-CoA, ktorý je hlavný prekurzorom biosyntézy lipidov. Druhý z uvedených enzýmov je zodpovedný za prítomnosť NADPH. Obsah dusíka v médiu ovplyvňuje koncentráciu AMP. Pri poklese dusíka dochádza k poklesu koncentrácie AMP, čím sa znižuje aktivita izocitrátdehydrogenázy v Krebsovom cykle. Po dosiahnutí určitej hodnoty citrát vstúpi do cytoplazmy cez trikarboxylátový transportér výmenou za malát a je rozštiepený ATP citrátlyázou na acetyl-CoA a oxalacetát. Táto schopnosť sa vzťahuje len na oleogénne mikroorganizmy.

Ak sú v médiu zdrojom uhlíka masné kyseliny a hydrofóbne materiály, jedná sa o *ex novo* biosyntézu TAG. V tomto prípade dusík nie je vyčerpaný a akumulácia lipidov je spojená s rastom bunky. *De novo* a *ex novo* biosyntézy nemôžu prebiehať zároveň. Dôvodom je syntetáza masných kyselín a ATP citrátlyáza, ktoré sú inhibované prítomnosťou masných kyselín. Výnimku tvorí *Pichia methanolica*, ktorá dokáže akumulovať tuky v prítomnosti glukózy [20] [21] [22].

## 2.4 Mutagenéza

Mutácie sú spôsobené zmenou sekvencie bází v DNA, ktorá sa ďalej dedí. Vznikajú zvyčajne pri chybnnej replikácii, či opravách DNA. Jedná sa o každú zmenu v géne, ktorá sa zachová aj počas jeho expresie, aj po skončení pôsobenia mutantného činiteľa. Mutagenéza sa používa pri klasických genetických štúdiách k identifikácii génov a k porozumeniu ich funkcií. Gény môžu byť detekované vďaka tomu, že ich mutované varianty vedú k pozorovateľným zmenám vo fenotype.

V dnešnej dobe je možné pripraviť mutanty, ktoré sú z priemyselného hľadiska výhodnejšie ako pôvodné kmene. Dochádza k zlepšeniu rady vlastností pri oslabení vlastností druhých.

Pri mutáciách je dôležitý čas pôsobenia mutagénu. Najlepším spôsobom je použitie takého mutagénu, pri ktorom je nízka úmrtnosť mikroorganizmu, ale vysoká frekvencia mutácie. Pre výskum genetických zmien a analýzu indukovaných mutantov je dôležitý rýchly rast unicelulárnych buniek v kolóniách a tvorba veľkej geneticky homogénnej populácie. Kvasinky sú vďaka tomuto ideálnym materiálom pre štúdium mutagenézy. Ďalšou z výhod je možnosť zistenia jedného zmutovaného kmeňa v miliónovej kolónii mikroorganizmov.

Krátka generačná doba vedie ku rýchlej selekcii mutantov a na základe ich malých génomov narastá pravdepodobnosť zasiahnutia špecifického génu. Výber mutagénu sa odvíja na základe druhu mutácie, ktorú chceme vyvolať a akú zmenu by sme chceli indukovať [23] [24] [25] [26] [27].

### 2.4.1 Typy mutácií

Rozoznávame mutáciu spontánnu (samovoľnú) a indukovanú. Spontánne mutácie sú také, ktoré vznikajú bez známych príčin. Tvorja sa pravdepodobne chybou pri replikácii alebo skrytým vplyvom prostredia. Mutácia indukovaná vzniká po zámernom pôsobení určitého chemického alebo fyzikálneho mutagénu na DNA.

Mutácie môžeme rozdeliť do troch skupín podľa svojho prejavu. Rozoznávame:

- Génové – dochádza k zámene nukleotidov alebo ich poradia
- Chromozómové – dochádza k zmene v štruktúre alebo v tvare chromozómu
- Genómové – vyznačujú sa zmenou počtu chromozómov

V génových mutáciách sa môžu mutácie vyskytnúť v oblastiach štruktúrnych génov, génov kódujúcich vznik jednotlivých produktov i v oblastiach s regulačnou funkciou, čím môže dôjsť k nadprodukcii génového produktu, jeho nedostatku, či jeho úplnej blokácii.

Jednotlivé typy génových mutácií môžeme rozdeliť do príslušných bodov na základe zmien, ku ktorým došlo v molekule DNA. [28] Sú to:

- Delícia – dochádza ku strate jedného alebo viacerých po sebe idúcich nukleotidov
- Inzercia – dochádza k včleneniu jedného alebo viacerých párov báz do pôvodnej sekvencie
- Inverzia – dochádza k prevrátenou dvoch alebo viac po sebe idúcich nukleotidov
- Substitúcia – je to zámena jedného nukleotidu za iný

### 2.4.2 Mutagény používané v mikrobiológii

K najdôležitejším a pre experimentátora aj k najbezpečnejším mutagénom patrí ultrafialové svetlo o vlnovej dĺžke 265 nm, nakoľko je najviac absorbované DNA. Radí sa medzi fyzikálne faktory spôsobujúce mutácie. Absorpcia UV svetla spôsobuje v molekule DNA dimerizáciu dvoch susedných pyrimidinových molekúl nachádzajúcich sa na rovnakom polynukleotidivom reťazci. Najčastejšie následky UV žiarenia sú cyklobután-pyrimidinové diméry (CPD) a 6'-4' pyrimidinpyrimidon-fotoprodukty (6-4 PP).

Medzi ďalšie veľmi účinné mutagény patria alkalické činidlá, napr. methylmethánsulfonát (MMS), či ethylmethánsulfonát (EMS). Alkylačné činidlá sú elektrofilné zlúčeniny, ktoré pomocou donorových alkylačných skupín reagujú s makromolekulami. Môžu spôsobovať narušenie dvojšróbovice DNA, viesť ku začleneniu chybného páru báz, či prekážať pri replikácii alebo transkripcii DNA. MMS modifikuje guanin na 7-methylguanin a adenin na 3-methyladenin, čo spôsobuje chybné párovanie báz a blokuje replikáciu [25] [28] [29] [30] [31].

## 2.5 Odpadné substráty

Vedľajšie produkty a medziprodukty z poľnohospodárskych a priemyslových výrobní často zaťažujú životné prostredie. Tie obsahujú ešte dostatok sacharidov, ktoré môžu byť premenené na chemické zlúčeniny vhodné k aplikácii v potravinárskom či farmaceutickom priemysle pomocou mikrobiálnej biotechnológie.

Karotenogénne kvasinky rastú v širokom spektre pH (2,5-9,5) a teplôt (5-26°C). Pri vystavení stresovým podmienkam začnú akumulovať viac pigmentu. Znalosť molekulárnych mechanizmov stimulácie produkcie môže viesť k zlepšeniu biotechnologických procesov.

Predmetom štúdia sa stáva premena zdrojov uhlíka na karotenoidné pigmenty spoločne s optimalizáciou rastového média pre kultiváciu kvasiniek. Ako substráty sa požívajú pentózy, hexózy, disacharidy, glycerol a iné [15] [32].

### 2.5.1 Glycerol

Glycerol je sladká sirupovitá kvapalina, takmer bezfarebná, silno hygroskopická. Je rozpustný vo vode a v alkohole, v nepolárnych rozpúšťadlách je nerozpustný. Je súčasťou prírodných tukov, pričom sa vyskytuje vo forme triacylglycerolov. Možno ho vyrobiť synteticky, fermentáciou cukru, hydrolýzou tukov, olejov, alebo ako vedľajší produkt pri výrobe mydla. Je vedľajším produktom pri výrobe bionafty. V období rozvoja bionafty je nadbytok surového glycerolu. Jeho čistenie je však drahé a hľadajú sa spôsoby pre likvidáciu. Možnými spôsobmi odstránenia nadbytočného glycerolu je spaľovanie, kompostovanie, či jeho tepelná úprava na propylénglykol [33] [34] [35].

### 2.5.2 Srvátka

Srvátka je tekutá zložka mlieka vzniknutá po oddelení pevnej zložky obsahujúcej kazeín a tuk. Je vedľajším produktom pri výrobe syrov, tvarohov či kazeínu. Najdôležitejšou a najpočetnejšou zložkou srvátky sú bielkoviny, konkrétne v týchto formách:

- Albumíny a globulíny
- Kazeín a parakazeín
- Albumózy a peptóny

Hlavnou zložkou je aj laktóza, ktorá sa nachádza v dvoch formách – nehygroskopická  $\alpha$ -laktóza a hygroskopická  $\beta$ -laktóza. Pri izbovej teplote nastáva rovnováha v pomere asi 40%  $\alpha$ -laktózy a 60%  $\beta$ -laktózy. Každý izomér má odlišné vlastnosti, čo má za následok rozličné vlastnosti laktózy za rozdielnych podmienok. Z organických kyselín sa v srvátke vyskytuje kyselina citrónová, mliečna, propiónová, octová i mravčia. V menšej miere obsahuje aj nebielkovinový dusík vo forme purinových zásad. V popole srvátky sú fosforečné a vápenaté soli, draslík, horčík, železo, síra a chlór v ionizovanej forme. Taktiež má vysokú biologickú hodnotu danú obsahom vitamínov a to najmä skupiny B, biotínu, kyseliny pantoténovej a vitamínu C. Tuk je v srvátke obsiahnutý v nepatrnom množstve, prípadne vôbec [36] [37] [38].

## 2.6 Spôsoby extrakcie významných metabolitov kvasiniek

Karotenoidné farbivá predstavujú veľmi zložitú zmes. Na spôsob izolácie má základný vplyv množstvo vody, tuku a pod. Najčastejším spôsobom získavania karotenoidov je extrakcia. Acetón sa používa najmä k izolácii karotenoidov z rastlinného materiálu obsahujúceho vyššie množstvo vody. V materiáli živočíšnom, rovnako ako aj kvasinkovom, sú však karotenoidy viazané prevažne v lipoproteínovej frakcii membrán a pre ich uvoľnenie je nutné zmydelniť takúto vzorku varom s alkoholickým roztokom hydroxidu draselného alebo hydroxidu sodného. Karotenoidy sa po zmydelnení viacnásobne extrahujú nepolárnymi organickými rozpúšťadlami, ako je napr. dietyléter, hexán alebo petroléter.

Lipidy tvoria skupinu lipofilných zlúčenín, ako sú acylglyceroly, voľné masné kyseliny, vosky, steroidy, zložené tuky, či v tuku rozpustné uhľovodíky, alkoholy, vitamíny a iné. V prevažnej väčšine sa k izolácii lipidov používa extrakcia nepolárnymi organickými rozpúšťadlami, ako je napr. dietyléter, hexán alebo petroléter.

V závislosti na druhu materiálu existuje rada metód extrakcií a následných analýz metabolitov. Metóda dvojkrokovej extrakcie lipidov podľa Folcha zahrňuje po dôkladnej homogenizácii a prefiltrovaní suspenzie extrakciu zmesou chloroform a methanol v pomere 2:1. V dnešnej dobe existuje mnoho modifikácií tejto metódy. Po centrifugácii horná fáza obsahuje väčšinou nelipidické nečistoty. K eliminácii strát niektorých veľmi polárnych lipidov sa používa KCl alebo  $\text{CaCl}_2$  [39] [40] [41] [42].

## **2.7 Analýza vybraných metabolitov kvasiniek**

Pre orientačné stanovenie karotenoidov je možné použiť spektrofotometrické metódy. K presnejšej separácii, identifikácii a kvantifikácii sa najčastejšie používajú chromatografické metódy, predovšetkým HPLC metóda na reverznej fáze. Používa sa v spojení s detektorom PDA (detektor s diódový poľom) alebo s hmotnostnou detekciou [42] [43].

### **2.7.1 Chromatografické metódy**

Sú to analytické metódy slúžiace k separácii zložiek zmesí. Na základe rozdielnej distribúcie separovaných analytov medzi dvomi vzájomne nemiešateľnými fázami dochádza k deleniu jednotlivých analytov. Prvá fáza je stacionárna (nepohyblivá) a druhá mobilná (pohyblivá). Dochádza k interakciám medzi analytom a mobilnou fázou, tak aj medzi analytom a stacionárnou fázou a nakoniec aj medzi mobilnou a stacionárnou fázou. Ide o procesy ako rozpúšťanie, zrážanie, chemisorpcia, adsorpcia a iné. Celkový čas analytu stráveného v kolóne je závislý na afinite k stacionárnej fáze. Takto sa od seba jednotlivé zložky separujú a prvé sa na koniec kolóny dostávajú látky menej zadržované [44] [45].

#### **2.7.1.1 RP-HPLC/PDA**

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia je považovaná za preferovanú metódu k separácii, identifikácii a kvantifikácii karotenoidov.

Často je využívaná reverzná fáza v izokratickom alebo gradientovom elučnom systéme s použitím C18 a C30 chromatografických kolón. Stacionárne fáze kolón C30 poskytujú lepšie separácie geometrických izomérov karotenoidov v porovnaní s C18, ale tie zase poskytujú lepšie separačné výsledky izomérov ako je b-karotén, luteín a zeaxantín.

Separčný proces prebieha na základe afínit a interakcie analytov s mobilnou fázou. Chromatograf sa skladá zo zásobnej fľaše s mobilnou fázou, odplyňovaču, pumpy, dávkovacieho zariadenia, termostatu, kolóny so stacionárnou fázou a detektoru. V prípade HPLC systému na rezervných fázach býva kolóna naplnená silikagélom s naviazanými nepolárnymi fázami. V prípade stacionárnej fáze typu C18, obsahuje stacionárna fáza oktadecylový zbytok naviazaný na silanolové skupiny. Mobilná fáza je teda polárna, je to najčastejšie zmes vody a polárnych rozpúšťadiel (aceton, methanol, acetonitril).

Pre identifikáciu zložiek zmesi a na identifikáciu látky je dôležitý tzv. retenčný čas. Je to doba, ktorú príslušná zlúčenina strávi v kolóne, alebo teda doba, ktorá uplynie od vstupu vzorky do kolóny až do vytvorenia maxima píku na chromatograme. Plocha píku nám „udáva“ koncentráciu látky. Pre kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie je nevyhnutné použiť kalibráciu na externý štandard.

Elúcia môže byť izokratická, kedy sa zloženie mobilnej fázy celú dobu analýzy nemení, alebo gradientová, kedy sa koncentrácia mení.

PDA detektor, alebo detektor diódového poľa, sníma celé spektrum. Princípom je žiarenie ktoré prechádza štrbinou, šošovkou, clonou na mernú celu detektora, kde sa spektrálne



rozkladá holografickou mriežkou. Na každú z fotodiód dopadá žiarivý tok o určitej vlnovej dĺžke zoslabený absorpciou v cele detektoru. Kondenzátor je nabitý na určitú hodnotu a s ním je spojená každá fotodióda. Vznikajúci prúd vybije kondenzátor. Meria sa prúd, ktorý je potrebný na dobitie príslušných kondenzátorov. Takýmto spôsobom sa zaznamenajú údaje o absorbancii pri každej vlnovej dĺžke v každom okamžiku [44] [45] [46].

## **2.8 Metódy molekulárnej identifikácie a charakterizácie kvasiniek**

Molekulárne metódy identifikácie kvasiniek sú dnes neoddeliteľnou súčasťou identifikácie a fylogenetického a taxonomického zaradenia kvasiniek. Ich hlavnými výhodami je, že sú veľmi rýchle v porovnaní s metódami tradičnej mikrobiológie. Metódy tradičnej mikrobiológie rozlišujú mikroorganizmy na základe ich morfológických a fyziologických vlastností. Tieto vlastnosti ale závisia na génovej expresii a sú do istej miery ovplyvnené podmienkami vonkajšieho prostredia. Štandardné metódy vyžadujú radu kultivačných testov, akými sú hodnotenie vzhľadu a tvaru kolónií, sporulácia a morfológia buniek, testy schopnosti asimilácie zdrojov uhlíka a dusíka, požiadavky na prítomnosť vitamínov, schopnosti kvasiť cukry, ďalej rôzne nároky kvasiniek na teplotu prostredia, koncentráciu cukrov a solí.

Hlavnou výhodou molekulárnych metód je, že nie sú závislé na podmienkach okolitého prostredia. Molekulárne metódy sú založené na rozdielnosti DNA sekvencií medzi jednotlivými kvasinkovými druhmi. K tomu, aby bolo možné porovnať sekvencie jednotlivých génov, je u týchto metód dôležité najprv izolovať jadrovú DNA daného druhu a pomocou metódy polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) amplifikovať požadovaný úsek DNA [2].

## **2.9 Ribozomálne gény sekvencie ITS1,2 D1/D2**

Červené kvasinky boli doteraz charakterizované najmä pomocou morfológických, fyziologických a biochemických vlastností. Obmedzením je malá znalosť prirodzeného prostredia daného mikroorganizmu, taktiež je náročné izolovať z prírody čistú kultúru napríklad u nekultivovateľných kvasinkových druhov.

Na základe molekulárno-biologických techník je umožnená lepšia identifikácia a taxonomické zaradenie kvasiniek. Využíva sa ribozomálna DNA, ktorá obsahuje množstvo konzervatívnych úsekov génomu s variabilnými sekvenciami.

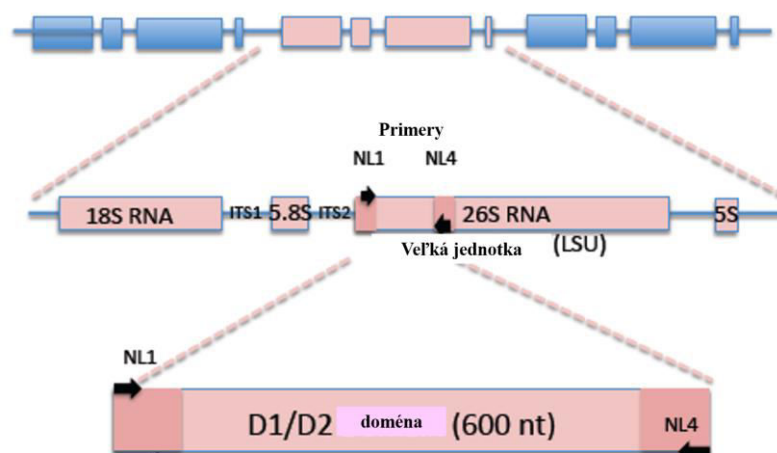
Najčastejšie používané techniky k taxonomickému a fylogenetickému zaradeniu sú polymerázová reťazová reakcia PCR a denaturačná gradientová gélová elektroforéza DGGE. Ku charakterizácii červených kvasiniek sú používané vysoko konzervované úseky génomovej DNA alebo mitochondriálnej DNA.

Konzervatívne sekvencie sa nachádzajú najmä v génoch kódujúcich malé (18S, 5.8S, 5S) a veľké (25 – 28S) podjednotky rRNA. V rámci každého klastru sa medzi podjednotkami vyskytujú tzv. vnútorné medzerníkové oblasti ITS. Názov ITS je skratkou z anglického „Internal Transcribed Spacer“. Je to medzerník medzi génmi pre malú (SSU) a veľkú (LSU) ribozomálnu podjednotku v jadrovej DNA (rDNA). ITS región je rozdelený génom pre 5,8S rRNA na ITS1 a ITS2. Štruktúra génového klastru je zvyčajne nasledujúca: 5' ETS (čo je vonkajší prepisovaný medzerník), 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 26S rRNA 20 3' ETS. Jednotlivé génové klastre sú oddelené intergenovými medzerníkmi (IGS) alebo neprepisovaným medzerníkom (NTS). Všetky oblasti majú potenciál pre rodové a druhové

odlíšenie. Výskum sa však zameriava na oblasť 18S (SSU), 26S (LSU) a ITS [47] [1] [48] [49].

Ribozomálna DNA u húb sa vyskytuje v genóme vo forme tzv. „head-to-tail“ tandemových repetícií. Nasvedčuje to tomu, prečo používať ITS región ako genetický marker. Dĺžka ITS regiónu vrátane 5,8S génu sa pohybuje v rozmedzí 270-972 bp [47] [1] [48] [49].

Doména D1/D2 veľkej podjednotky 26S rDNA (LSU) sa skladá z približne 600 nukleotidov a môže byť sekvenovaná pre všetky známe druhy kvasiniek. Táto oblasť je používaná pri rutinej identifikácii kvasiniek a fylogenetických štúdiách. Zrovnanie sekvencií môže byť taktiež použité pre malé podjednotky 18S rDNA, ale databázy nie sú tak obsiahle a sekvenčné rozdiely nemusia byť dostatočné, aby sa umožnilo odlíšenie blízko príbuzných druhov. Oblasti ITS rDNA (ITS1, ITS2 a 5,8S) vykazujú vyššiu mieru divergencie ako domény D1/D2 LSU rDNA a preto sú vhodnejšie pre druhové odlíšenie [47] [1] [48] [49].



Obr.5. Kvasinková ribozomálna DNA, ITS1-5,8S-ITS2 region a D1/D2 [50]

### 2.9.1 Izolácia DNA

Prvým krokom molekulárnej analýzy je izolácia genómovej DNA. Bunky sú chránené bunkovou stenou, ktorú je treba vhodným spôsobom rozrušiť. Lýza, alebo rozrušenie buniek, je základným predpokladom pre samotnú izoláciu nukleových kyselín. Podstatou je dezintegrácia bunkovej steny, aby došlo k uvoľneniu a k následnej izolácii DNA.

Existuje celá rada izolačných metód. Všetky izolačné metódy vychádzajú z fyzikálnych a chemických vlastností nukleových kyselín, ktoré sa pri neutrálnom pH chovajú ako anióny. Táto vlastnosť vyplýva z prítomnosti silne kyslých fosfátových skupín. Polarita DNA sa odráža v možnostiach precipitácie alkoholom. Medzi najčastejšie používané chemické látky určené k dezintegrácii sú Tris-EDTA, enzymatické činidlá (lyzozým) a detergenty (dodecylsulfát sodný). Steny kvasiniek môžu byť narušené taktiež mechanickými metódami (homogenizácia, mlyny). Po rozrušení bunkovej steny vzniká hrubý lyzát buniek, z ktorého je DNA následne izolovaná. Lyzát obsahuje okrem DNA a RNA taktiež nízkomolekulárne uhl'ovodíky, polysacharidy, lipidy a bielkoviny. Z tejto zmesi môže byť DNA izolovaná pomocou enzýmov. K odstráneniu RNA je používaná ribonukleáza A a pre odstránenie proteínov proteínáza K. Tento krok je dôležitý, pretože lyzát obsahuje enzýmy, ktoré môžu degradovať DNA.

Ďalšou metódou používanou k izolácii DNA z lyzátu je fenol-chloroformová extrakcia. K lyzátu buniek je pridaná zmes fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Táto extrakcia

využíva denaturačné a inhibičné účinky organických rozpúšťadiel. Dochádza k odstraňovaniu hrubých zložiek lyzátov buniek a k ponechaniu nukleových kyselín. Izoamyalkohol zvyšuje rozpustnosť fenolu v chloroforme. Fenol je organické rozpúšťadlo, ktoré sa používa k oddeleniu proteínov od nukleových kyselín. Proteíny sú hydrofóbne a ostávajú v organickej fáze, zatiaľ čo nukleové kyseliny sú vysoko nabité a prechádzajú do vodnej fáze. Chloroform denaturuje proteíny, rozpúšťa tuky a napomáha k oddeleniu jednotlivých fáz. Oddelenie sa urýchli centrifugáciou.

Vzniknutá zmes sa rozdelí na tri fázy. Na hornú - vodnú fázu, v ktorej sú rozpustené nukleové kyseliny, dolnú-organickú fázu a medzifázu, ktorá je zložená z denaturovaných proteínov a zvyšku buniek. V súčasnosti sú veľmi často používané purifikačné kity, ktoré obsahujú predpripravené roztoky a zaisťujú vysokú čistotu aj koncentráciu izolovanej DNA. Roztok obsahuje SDS ako detergent k odstráneniu lipidov, soli pre naviazanie DNA na silikové membrány, roztoky obsahujúce ethanol pre prečistenie DNA a roztoky o vhodnom pH obsahujúce TRIS-HCl pufrý pre rozpustenie a uchovávanie DNA [51] [52].

### 2.9.2 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (PCR, z anglického „Polymerase Chain Reaction“ je syntéza určitého úseku denaturovanej DNA v smere 5'→3', ktorú sprostredkúva DNA polymeráza. Amplifikovaný úsek DNA je ohraničený krátkymi primerami (oligonukleotidy), ktoré na základe komplementarity prisadajú na konce vybraného úseku a od nich prebieha syntéza DNA. Reakčná zmes obsahuje:

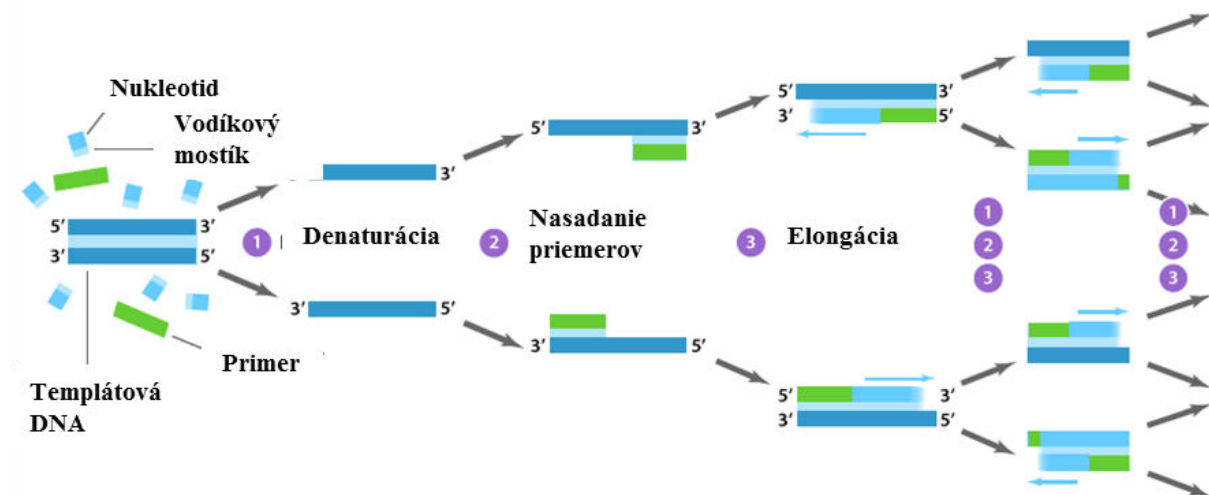
- DNA templát – matrica pre syntézu nových reťazcov.
- Priméry – krátke oligonukleotidy, komplementárne k vybraným úsekom DNA k amplifikácií.
- Termostabilnú DNA polymerázu – syntetizuje nový reťazec DNA v smere 5' → 3' podľa sekvencie nukleotidov v komplementárnom reťazci templátu DNA od miesta naviazania primeru.
- dNTP – zmes všetkých štyroch deoxyribonukleotidov, sú základnými kameňmi pre výstavbu nového reťazca.
- PCR pufor – vytvára optimálne prostredie pre DNA polymerázu, obsahujúci Mg<sup>2+</sup> ióny, pôsobiace ako kofaktor na udržanie enzymatickej aktivity *Taq* DNA polymerázy
- PCR voda – na doplnenie PCR zmesi do požadovaného objemu.

Syntéza novej DNA prebieha v troch krokoch:

- 1) Denaturácia – dvojreťazcová molekula DNA (dsDNA) sa zahrieva na teplotu 94-98°C po dobu 20-30 s. Dochádza k rozrušovaniu vodíkových mostíkov a k rozvoľňovaniu dvojšrobovnice na dve jednoreťazové molekuly DNA.
- 2) Hybridizácia (annealing) – teplota sa postupne zníži na 50-65°C a dôjde k nasadeniu primerov na špecifické miesta DNA.
- 3) Elongácia – syntéza nových reťazcov DNA je katalyzovaná termostabilnou polymerázou (izolovanou z baktérie *Thermus aquaticus*). Optimum aktivity je v rozmedzí 65-75°C (v závislosti na použitej DNA polymeráze). V smere od 5'konca k 3' koncu prirastá vlákno DNA komplementárne k pôvodnej molekule DNA.

Postupným opakovaním tohoto procesu sa syntetizuje až 10<sup>9</sup> kópií vybraného úseku DNA. Počet cyklov závisí na východzej koncentrácii templátovej DNA. Reakcie prebiehajú v termocykloch, v automaticky naprogramovaných časových intervaloch. Ako návrh oligonukleotidových primerov, tak aj programovanie reakčných krokov vychádza

zo všeobecnej znalosti štruktúry DNA a zo znalosti sekvencie, ku ktorej sú príslušné oligonukleotidy komplementárne. Z toho vyplýva, že pre PCR je nutné poznať sekvencie aspoň hraničných úsekov fragmentov, ktoré majú byť amplifikované. Priméry su navrhované pomocou počítačových programov. Je dôležité, aby došlo ku špecifickej väzbe iba k jednému miestu v genóme, preto sa na 3' konce primerov zaraďujú 1-2 zvyšky guanínu alebo cytozínu a zároveň aby sa obsah týchto nukleotidov pohyboval v rozmedzí 40-60. Dôležité je, aby priméry nevytvárali vlásenky, duplexy a aby teplota topenia primerov bola podobná, minimálne 50°C [53] [54].



Obr.6. Proces polymerázovej reťazovej reakcie (PCR)

### 2.9.3 Denaturačná gélová gradientová elektroforéza (DGGE)

Jedná sa o tzv. metodu otláčku prstu, pretože slúži k presnému určeniu mikroorganizmov, najmä v spojení s PCR bakteriálnych a kvasinkových ribozomálnych génov. Denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE) je metóda, ktorá slúži na detekciu už jednonukleotidových zámien v molekule DNA. Princípom metódy je rozdielna elektroforetická mobilita denaturovanej (ssDNA) a nedenaturovanej DNA (dsDNA) v polyakrylamidovom géle so vzrastajúcim denaturačným gradientom. Ten je sprostredkovaný vzrastajúcou teplotou alebo koncentráciou denaturačných činidiel, ktorými sú v tomto prípade formamid a močovina. V polyakrylamidovom géle dochádza k denaturácii dvojreťazovej DNA na základe teploty topenia, ktorý závisí od zloženia jednotlivých bází. Rýchlosť denaturácie a tým aj elektroforetická pohyblivosť fragmentov závisí na počte vodíkových väzieb medzi nukleotidmi a na množstve dusíkatých báz dsDNA. Guanínové a cytozínové báze v molekule DNA denaturujú za vyšších teplôt v dôsledku stability. Reťazce DNA sa budú od seba ľahšie oddeľovať v miestach, v ktorých je častejší výskyt A-T párov, ktoré sú spojené dvomi vodíkovými mostíkmi, úseky bohaté na G-C páry sú stabilnejšie vďaka spojeniu tromi vodíkovými mostíkmi. Rozoznávame dva základné typy DGGE, ktoré sa líšia spôsobom denaturácie DNA produktov. Najpoužívanejším druhom pre stanovenie polymorfizmu kvasinkových kmeňov je paralelná DGGE, okrem nej existuje ešte TGGE (teplotná gradientová elektroforéza). Jednotlivé PCR produkty o rovnakej veľkosti, ale rozdielnej sekvencii sú analyzované vo vhodnom denaturačnom rozmedzí. Polymorfizmy sú rozlíšené na základe jednotlivých fragmenov pre príslušný kmeň na géle alebo taktiež

umiestnením fragmentov v denaturačnom gradiente. Pre lepšiu rozlíšiteľnosť fragmentov je možno použiť primery predĺžené o GC svorky [51] [55] [56].

#### 2.9.4 Sekvenovanie

Sekvenovanie je metóda, ktorá umožňuje stanovenie primárnej štruktúry DNA, teda poradie nukleotidov. Metódy sekvenovania nukleových kyselín zaznamenali za posledných 10 rokov veľký pokrok. Vďaka optimalizácii prípravy vzoriek, povrchovej chémii, fluorescenčným značkám, enzýmovým reakciám, optike a elektronike je možné získavať údaje o poradí báz z jednotlivých molekúl DNA. Objavili sa nové postupy a metódy, ktorými sa proces sekvenovania DNA zrýchlil a stal sa finančne menej náročný. Je možné určenie kompletných genómov a detailná analýza vybraných úsekov DNA alebo štúdium exprese génov.

Medzi tradičné metódy sekvenovania patrí Sangerova a Maxam-Gilbertova metóda. Sangerova metóda je taktiež označovaná ako dideoxy sekvenácia alebo enzýmová sekvenácia. Je založená na sekvenácii pomocou detekcie ukončenia predlžujúceho sa vlákna DNA. K tomu sa využíva dideoxynukleotid (ddNTP). Princípom je zotrhanie reťazca DNA na kratšie úseky, naklonovanie do vektorov a následná amplifikácia *in vivo* v bakteriálnych bunkách. Z tých sa extrahujú plazmidy nesúce klonované fragmenty. Po začlenení deoxynuklidov do sekvencie sa znemožní vytvorenie fosfodiesterovej väzby s ďalším nukleotidom a ukončí sa reťazec DNA. Fragmenty sú denaturované a roztriedené podľa veľkosti pomocou elektroforézy. Patrí k najpoužívanejšej a najpresnejšej metóde *de novo*. Dĺžka fragmentov sa pohybuje okolo 700-800 bp. Novšou modifikáciou je použitie kapilárnej elektroforézy miesto štandardnej elektroforézy, ktorá prebieha jednej sklenenej kapiláre, a každý ddNTP je značený iným fluorescenčným farbivom. Pri polymerázou katalyzovanej syntéze komplementárnych vlákien v reakčnom roztoku obsahujúcom zmes štandardných nukleotidov a označených terminálnych nukleotidov vznikajú fragmenty DNA rozličnej dĺžky.

Maxam a Gilber vyvinuli metódu založenú na chemickej modifikácii DNA a následnom štiepení dNTPs. Možno sekvenovať dsDNA i ssDNA. Krátke sekvencie DNA sú označené rádioaktívnym fosforom ( $^{32}\text{P}$ ) na 5' alebo 3'-konci a delí sa na fragmenty, ktoré sú vystavené chemickému pôsobeniu. Fragmenty sú podrobené elektroforéze a  $\gamma$ -žiareniu, čo ma za následok zosvetlenie častí DNA, ktoré boli označené  $^{32}\text{P}$ . Metódy založené na klasickej Sangerovej sekvenácii DNA sa považujú za metódy prvej generácie. Okrem vyššie uvedených metód sa vyvíjajú ďalšie metódy sekvenovania [51] [57] [58].

### 2.10 Prietoková cytometria

Prietoková cytometria (Flow Cytometry-FC) je analytický nástroj umožňujúci analýzu na úrovni jednej bunky (single-cell-level). Je založená na meraní a analýze biologických a fyzikálnych vlastností vyšetrovaných častíc unášaných nosnou kvapalinou (modifikovaným fyziologickým roztokom) interagujúcou so svetelným žiarením prístroja. Základné veličiny ktoré sa analyzujú sú veľkosť častíc, denzita (granularita) vnútorného obsahu a intenzita fluorescencie. Proces je riadený fluidným systémom.

Do stredového jadra (central core) je privedená suspenzia buniek. Nosná kvapalina preteká vnútorným plášťom jadra. Strháva bunky vďaka rýchlosti a mení tok na parabolický. Najvyššia rýchlosť toku je v strede a táto sila umožňuje suspenzií buniek pohyb. Tento jav sa nazýva hydrodynamická fokusácia. Vychádzajúce bunky sú ožiarované zdrojom svetla, najčastejšie lasermi. Svetlo je rozptyľované, prechádza filtrami a fotonásobičmi a sú snímané

v dvoch smeroch dvomi detektormi. Priamy rozptyl (forward scatter FSC, tiež Small Angle Light Scattering – SALS) detekuje veľkosť, bočný rozptyl (side scatter SSC, alebo Large Angle Light Scattering- LALS) poskytuje informácie o vnútornej stavbe a povrchu buniek. Ďalšie informácie získame snímaním emisie fluorofórov pridaných ku vzorke po excitácií laserom s vhodnou vlnovou dĺžkou. K detekcií slúžia 4 druhy filtrov. Prepúšťajú len svetlo určitých vlnových dĺžiek, iné sú blokované. Rôzne čidlá sa viažu na bunečné organely, v cytoplazme, prípadne na povrchu buniek. Dochádza k takej interakcii elektrónov, že je vytvorená a zvýšená schopnosť danej molekulárnej štruktúry fluoreskovať po excitácii. Signál z optiky je prevedený na elektrický impulz, ktorý sa spracuje počítačovým programom. Výsledkom sú histogramy [59] [60] [61] [62].

### **3 CIEĽ PRÁCE**

Cieľom diplomovej práce zameranej na štúdium riadenia metabolizmu karotenogénnych kvasiniek na molekulárnej úrovni je riešenie nasledujúcich úloh:

- 1 Rešerš zameraná na metabolizmus lipotvorných a karotenogénnych kvasiniek.
- 2 Screening vybraných karotenogénnych kvasiniek – produkcia biomasy a metabolitov na rôznych substrátoch.
- 3 Charakterizácia genómu a vybraných génov kvasiniek.
- 4 Vplyv UV mutagenézy na metabolickú aktivitu a genóm kvasiniek.

## **4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

### **4.1 Mikrobiálne kmene, chemikálie a prístrojové vybavenie**

#### **4.2 Použité chemikálie**

##### **4.2.1 Kultivácia**

Kvasničný autolyzát (Himedia; India)

D-glukóza monohydrát (Penta; ČR)

Pepton (Himedia; India)

Síran sodný (Lach-Ner; ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner; ČR)

Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner; ČR)

Agar type I (Himedia; India)

Škrob (Lach-Ner; ČR)

Odpadná srvátka (Savencia, Pribyslav)

Laktóza monohydrát (Lach-Ner; ČR)

Glycerol (Lach-Ner; ČR)

D-mannóza (Sigma-Aldrich; Nemecko)

D-xylóza (Serva; Nemecko)

Yeast Nitrogen base without Amino Acids (Sigma-Aldrich; Nemecko)

Kvasničný autolyzát (Himedia; India)

Pepton (Himedia; India)

Síran sodný (Lach-Ner; ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner; ČR)

Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner; ČR)

Uhličitan sodný (Lach-Ner; ČR)

Hydrogenuhličitan sodný (Penta; ČR)

Síran sodný (Lach-Ner; ČR)

Tetrahydrát vlnanu sodno-draselného (Lach-Ner; ČR)

Pentahydrát síranu měďnatého (Lach-Ner; ČR)

Molybdenan amónny (Lach-Ner; ČR)

Kyselina sírová (Penta; ČR)

Heptahydráthydrát hydrogenarseničnanu sodného (Sigma-Aldrich; Nemecko)

##### **4.1.1 Izolácia DNA, elektroforéza, DGGE**

Triton X-10 (Sigma-Aldrich; Nemecko)

Dodecylsíran sodný (SDS) (Penta; ČR)

Chlorid sodný (Lach-Ner; ČR)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Penta; ČR)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner; ČR)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Fischer scientific; ČR)

Ethanol

Sklenené guľičky

Fenol-chloroform-isoamylalkohol (Sigma-Aldrich; Nemecko)



Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner; ČR)  
Kyselina octová (Lach-Ner; ČR)  
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Fischer Scientific; ČR)  
Agaróza (Thermo Fischer Scientific; USA)  
Ethidium bromid (Serva; Nemecko)  
Bromfenolová modrá – sodná soľ (Serva; Nemecko)  
Glycerol (Lachema; ČR)  
DNA marker (Top-Bio; ČR)  
MiliQ voda pro PCR  
PPP Master Mix (Top-Bio; ČR)  
KAPA Long Range DNA Polymerase (KAPA BIOSYSTEMS; USA)  
KAPA2G Robust HotStart (KAPA BIOSYSTEMS; USA)  
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs; Veľká Británie)  
Syntetické primery NL1, NL4, LS2, ITS1, ITS4, ITS2, ITS3 (Elisabeth Pharmacon; ČR)  
DNA Ladder (Nipon Genetics; Nemecko)  
DNA marker (Top-Bio; ČR)  
Carrier-ACRYL (Top-Bio; ČR)  
Octan sodný (Top-Bio; ČR)  
96% ethanol (Top-Bio; ČR)  
75% ethanol (Top-Bio; ČR)  
Tris-HCl + EDTA (Top-Bio; ČR)  
Akrylamid (Serva; Nemecko)  
N,N'-metylenbisakrylamid (Serva; Nemecko)  
Formamid (Sigma-Aldrich; Nemecko)  
Močovina (Penta; ČR)  
TAE pufor

#### 4.2.2 Prístroje a pomôcky

Očkovací box Aura mini (Bioair Instruments, UK)  
Vodná lázeň EL-20D Kavalier (ČR)  
Ultrazvuková vaňa PS02000 (ČR)  
Vortex, Ika Vortex genius 3 (SRN)  
Analytické váhy BOECO (SRN)  
Mikrocentrifúga Mikro 200 Hettich Zentrifugen (SRN)  
Centrifúga U-32R Boeco (Germany)  
Centrifúga Sigma Laborzentrifugen (SRN)  
HPLC/PDA zostava: zostava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)  
    Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)  
    Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR  
    Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR  
    Vyhodnocovací systém Xcalibur  
    Kolona Kinetex C18, 5 mm, 4,6 x 150 mm,  
    Phenomenex Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)  
    Předkolona - C18,AJ0 - 4287, Phenomenex  
Laminární box (Bio Air; Esco Class II BSC)

Mikrocentrifuga (Clever; National labnet)  
 Mikrovlnka (Professor)  
 Opticko mechanický adaptér (Canon)  
 PCR cyklér (Corber research; Bio-rad)  
 PDA/HPLC (ThermoFischer scientific)  
 Prietokový cytometer (Apogee flow systems)  
 Sušiareň (Memert)  
 Synchronis C18 kolona (Phenomenex; USA)  
 UV/VIS spektrofotometr (Boeco)  
 UV transiluminátor (Major Science)  
 Zdroj napätia (Biotech)  
 Termostatovaná trepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o. (ČR)  
 Trepačka Yellow line, (SRN)  
 Elektroforetická aparátúra, Mini-PROTEAN, BioRad (USA)  
 Termostat- Memmert INB 400 (SRN)  
 ELISA Reader BioTek ELx808  
 Bežné laboratórne sklo

#### 4.2.3 Použité kvasinkové kmene

Karotenogénne kvasinky boli vybrané podľa fyziologickej podobnosti a taxonomického zariadenia. Čísla 1, 4, 5, 6, 7, 8, 8, 9, 21 majú kvasinky v našej laboratórnej zbierke a budú použité v praktickej časti tejto diplomovej práce.

| Označenie | Druh                                     | Zbierkové číslo CCY |
|-----------|--|---------------------|
| 1         | <i>Rhodotorula aurantiaca</i>            | 20_9_7              |
| 4         | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>          | 20_7_28             |
| 5         | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>          | 20_7_31             |
| 6         | <i>Phaffia rhodozyma</i>                 | 77_1                |
| 7         | <i>Cystofilobasidium capitatum</i>       | 10_1_1              |
| 8         | <i>Cystofilobasidium capitatum</i>       | 10_1_2              |
| 9         | <i>Cystofilobasidium macerans</i>        | 17_9_3              |
| 21        | <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> | 17_18_4             |

Tab. 1. Príslušné označenie karotenogénnych kvasiniek a ich zbierkové číslo CCY (Culture Collection of Yeasts)

### 4.3 Molekulárne metódy

#### 4.3.1 Izolácia kvasinkovej DNA

Izolácia kvasinkovej DNA bola uskutočnená nasledujúcim spôsobom. Peleta bola odobraná z agaru pomocou kľučky do skúmavky typu Eppendorf. K pelete bolo pridaných 300 µl lyzačného pufru a 200 µl sklenených guľčiek. Následne bolo pridaných 300 µl roztoku fenol-izoamylalkoholu a skúmavky boli vortexované 10 min pri najvyššej rýchlosti a následne centrifugované po dobu 5 min pri 13 000 otáčkach za minútu. Opatrne bolo prevedených 200 µl vrchnej fázy do novej skúmavky typu Eppendorf. K vrchnej fáze bolo pridaných 500 µl

vopred vychladeného 100% ethanolu. Vzorky boli umiestnené do mrazničky pri teplote -20°C po dobu 20 minút. Po uplynutí času boli vzorky centrifugované rovnako ako predchádzajúcim spôsobom. Ethanol bol odstránený od pelety pomocou vákuovej vývevy a odsávacej banky. K pelete bolo pridaných 500 µl 70% roztoku ethanolu a opäť boli centrifugované po dobu 5 minút pri 13 000 otáčkach za minútu. Ethanol bol odstránený pomocou vákuovej vývevy a odsávacej banky a vzniknutá DNA sa nechala uschnúť v skúmavke po dobu 15 minút v sušiarňi pri teplote 37°C. K takto vysušenej DNA bolo pridaných 50 µl vody pre PCR, následne skúmavky 5 minút stáli a boli vortexované.

Koncentrácia vyizolovanej DNA bola sledovaná spektrofotometricky. Nukleové kyseliny majú absorpčné maximum pri 260 nm, proteíny, ktoré sú považované ako kontaminanty absorbujú pri 280 nm. Z pomeru hodnôt A260/A280 sa stanovila čistota DNA. Pomer absorbancii čistej DNA sa pohybuje v rozmedzí 1,8-2,0. Pri kontaminácií proteínmi je pomer menší ako 1,8. Pri výskyte RNA je pomer vyšší ako 2,0.

#### 4.3.2 Precipitácia DNA

Čistenie DNA sa uskutočnilo pomocou purifikačného kitu nasledujúcim spôsobom.

K 25 µl DNA bolo pridaný 2,5 µl 3M octanu sodného (pH 5,2), 1 µl Carrier – ACRYLu, 75 µl 96 % ethanolu. Zmes bola zvortexovaná a uložená do mrazničky pri teplote -20°C na dobu minimálne 30 minút. Po uplynutí doby bola zmes centrifugovaná vo vopred vychladenej centrifuge na 4°C 15 minút pri 14 000 otáčkach za minútu. Následne bol supernatant odstránený a ku pelete bolo pridaných 200 µl 75 % ethanolu. Následovala opäť centrifugácia po dobu 2 minút, odstránenie supernatantu a peleta bola ponechaná sušeniu pri teplote 37-66°C po dobu 15 minút. Po uplynutí doby bola DNA rozpustená v 10mM TRIS-HCl s 1mM EDTA pufru v 25 µl.

#### 4.3.3 Optimalizácia PCR

Molekulárna charakterizácia karotenogénnych kmeňov bola prevedená pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Úspešnosť krokov amplifikácie bola overená pomocou agarózovej elektroforézy a pomocou DGGE boli analyzované špecifické časti kvasinkovej DNA.

Optimalizácia PCR sa uskutočnila sledovaním zmien teplôt zodpovedajúcich za denaturáciu a za nasadenie primerov (annealing). Optimalizácia PCR dlhej oblasti kvasinkovej rDNA bola amplifikovaná pomocou primerov ITS1 a NL4, pre oblasť ITS1 boli použité primery ITS1 a ITS2, pre oblasť 5,8S-ITS2 primery ITS3 a ITS4 a pre amplifikáciu D1/D2 oblastí primery NL1 a LS2. Na amplifikáciu boli použité štyri rôzne kity: Top-Bio, KAPA2G Robust, KAPA Long Range a BioLABS.

#### 4.3.4 Molekulárna charakterizácia štandardných kmeňov karotenogénnych kvasiniek

Pre PCR slúžil ako templát kvasinková DNA izolovaná v predchádzajúcom kroku. Jednotlivé komponenty pre PCR boli krátko zvortexované a zcentrifugované. Všetky komponenty boli pripravené a použité za sterilných podmienok, aby sa zabránilo nožnej kontaminácii. Zmes bola pripravená v príslušnom objeme podľa počtu vzoriek do skúmaviek typu Eppendorf. Najskôr bol pripravený tzv. Master mix, ktorý obsahoval zmes komponent pre PCR okrem templátovej DNA. Po rozpipetovaní Master mixu do skúmaviek typu Eppendorf bola na záver pridaná templátová DNA. Pre overenie čistoty všetkých komponent bola do reakcie zaradená tiež negatívna kontrola. Mala rovnaké zloženie PCR zmesi, avšak namiesto templátovej DNA

obsahovala sterilnú PCR vodu. Objem a koncentrácia jednotlivých komponentov je nasledovná.

Reakčná zmes kitu TopBio o objeme 25 µl bola pripravená zmiešaním 12,5 µl Master Mixu, 9,5 µl H<sub>2</sub>O pre PCR, 1 µl forward primeru 10x riedeného, 1 µl reverse primeru 10x riedeného a 1 µl templátovej DNA.

Reakčná zmes kitu KAPA 2G Robust o objeme 25 µl bola pripravená zmiešaním 5 µl 5X KAPA2G pufri A obsahujúceho 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10 mM dNTP, 1,25 µl forward primeru 10x riedeného, 1,25 µl reverse primeru 10x riedeného, 1 µl templátovej DNA a 0,1 µl a 0,2 µl 5 U/µl KAPA2G Robust DNA polymerázy, pričom koncentrácia bola 0,5 U a 1 U. Reakčná zmes bola doplnená do 25 µl sterilnou PCR vodou.

Reakčná zmes kitu KAPA LongRange o objeme 25 µl bola pripravená zmiešaním 5 µl 5X KAPA LR pufri bez Mg<sup>2+</sup>, 1,75 µl 0,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 µl 10 mM dNTP, 1,25 µl forward primeru 10x riedeného, 1,25 µl reverse primeru 10x riedeného, 1 µl templátovej DNA a 0,1 µl 5 U/µl KAPA LongRange DNA polymerázy.

Reakčná zmes kitu New England BioLabs o objeme 25 µl bola pripravená zmiešaním 5 µl 5X Q5 reakčného pufri, 5 µl 5X Q5 High GC enhanceru, 0,5 µl 10 mM dNTP, 1,25 µl forward primeru 10x riedeného, 1,25 µl reverse primeru 10x riedeného, 1 µl templátovej DNA a 0,1 µl Q5 High-Fidelity DNA polymerázy. Reakčná zmes bola doplnená do 25 µl sterilnou PCR vodou

Po príprave sú vzorky krátko zcentrifugované a prenesené do termocyklu, kde prebiehali jednotlivé cykly podľa Tab. 2

Tab. 2. Podmienky PCR

|                           | TopBio   |                | KAPA2G Robust |                 | KAPA Long Range |                 | BioLabs |               |
|---------------------------|----------|----------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|---------------|
|                           | Teplota  | Doba           | Teplota       | Doba            | Teplota         | Doba            | Teplota | Doba          |
| <b>Úvodná denaturácia</b> | 94; 95°C | 2; 5; 10 min   | 95; 96°C      | 5; 10 min       | 94°C            | 2 min           | 98°C    | 30 s          |
| <b>Denaturácia</b>        | 94; 95°C | 15; 30 s       | 95; 98°C      | 15; 30 s        | 94°C            | 15 s            | 98°C    | 10 s          |
| <b>Annealing</b>          | 56°C     | 15; 30 s       | 56; 58; 60°C  | 15; 30 s        | 56; 58; 60°C    | 15 s            | 56°C    | 30 s          |
| <b>Elongácia</b>          | 72°C     | 30 s; 1; 2 min | 72°C          | 30 s a 1; 2 min | 72°C            | 30 s a 1; 2 min | 72°C    | 45 s; 1,5 min |
| <b>Finálna extenzia</b>   | 72°C     | 2; 5 min       | 72°C          | 2 min           | 72°C            | 5 min           | 72°C    | 5 min         |
| <b>Chladienie</b>         | 4°C      | 5 min          | 4°C           | 5 min           | 4°C             | 5 min           | 4°C     | 5 min         |

#### 4.3.5 Kontrola PCR produktov horizontálnou elektroforézou

Úspešnosť oboch krokov amplifikácie bola overená pomocou agarózovej elektroforézy. K PCR produktom bola pridaná signálna farba (pozostávajúcou z 0,025g brómfenolovej modrej a 4 g sacharózy v 10 ml redistilovanej vody). Ako veľkostný štandard bol použitý DNA ladder FastGene.

Pre prípravu agarózového gélu bolo 1,8 g agarózy rozpustenej v 980 ml miliQ vody a v 20 ml 50x koncentrovanom Tris-acetátovom (TAE) pufre. Zloženie pufri je uvedené v Tab. 3 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**

Tab. 3. Zloženie 50x koncentrovaného TAE pufru

| Chemikálie                    | Množstvo |
|-------------------------------|----------|
| Tris-HCl                      | 242 g    |
| Koncentrovaná kyselina octová | 51,1 ml  |
| 0,5M EDTA (pH 8)              | 100 ml   |

Agaróza bola rozpustená zahriatím v mikrovlnnej rúre. Do elektroforetickej vane bolo nanesených 50  $\mu$ l ethidiumbromidu a agaróza. Po jemnom premiešaní bol vložený hrebeň pre vytvorenie jamiek a gél bol ponechaný tuhnutiu po dobu 30 minút. Po stuhnutí bol hrebeň odňatý a do jamiek boli napiperované vzorky (14  $\mu$ l) zmiešané s farbiacim pufrom (2  $\mu$ l) a ladder (10  $\mu$ l). Elektroforetická vaňa so vzorkami bola zaliata 1x koncentrovaným TAE pufrom po vyznačenú rysku. Aparatúra bola pripojená k jednosmernému zdroju prúdu a elektroforéza prebiehala pri podmienkach 110 V, 400 mA po dobu 1 hodiny. Po skončení elektroforézy bol gél prenesený do vizualizačnej komory systému Ultralum. Po osvetlení UV svetlom sa zviditeľnili bandy sledovaných PCR produktov odpovedajúce svojej veľkosti.

#### 4.3.6 Analýza špecifickej časti kvasinkovej DNA pomocou DGGE

Pre denaturačnú gradientovú elektroforézu bol použitý 8% polyakrylamidový gél. Najprv bol pripravený roztok 40% AA/BIS o nasledujúcom zložení. Do 200 ml odmernej banky bolo navážených 76 g akrylamidu a 4 g bis-akrylamidu a banka bola doplnená po rysku miliQ vodou. Podľa Tab. 4 boli do 100 ml odmerných baniek pripravené 0%, 30%, 50%, 60%, 70% a 80% zásobné roztoky denurantov.

Tab. 4. Zloženie zásobných roztokov pre 8% polyakrylamidový gél

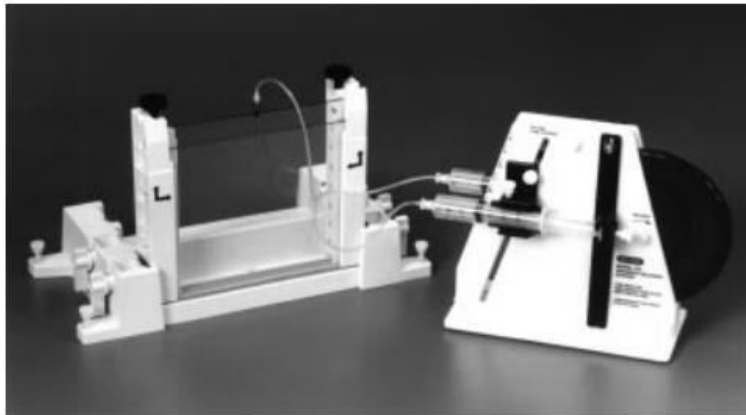
| komponenty              | 0%  | 30%  | 50% | 60%  | 70%  | 80%  |
|-------------------------|-----|------|-----|------|------|------|
| 40% AA/BIS (ml)         | 20  |      |     |      |      |      |
| 50xTAE pufor (ml)       | 2   |      |     |      |      |      |
| formamid                | 0   | 12   | 20  | 24   | 28   | 32   |
| močovina                | 0   | 12,6 | 21  | 25,2 | 29,4 | 33,6 |
| celkový objem vody (ml) | 100 |      |     |      |      |      |

Polyakrylamidový gél bol pripravený následovne. K zalepeniu okrajov bol použitý 8% gél bez denaturačných činidiel. Ku všetkým géloom bolo pridaných 40  $\mu$ l APS (amonium persulfát) a 8  $\mu$ l TEMED (N,N'-tetramethylendiamin), čím bola iniciovaná polymerizácia. Po zpolymerizovaní bol naliaty gél s denaturačným gradientom. Pre ITS1 oblasti kvasinkovej DNA bol použitý denaturačný gradient 60 – 80 % denaturačných činidiel pro ITS2 50 – 70 % a pro D1/D2 30 – 50% a 50 – 80 % denaturačných činidiel.

Gély boli nasaté do plniacich striekačiek a vložené do aparatúry. Zloženie aparatúry je na Obr.7. Pohybom otočného kola boli roztoky v hadičkách zmiešané a pomocou ihly nadávkované tak, aby gradient denaturačných činidiel bol v spodnej časti menší a v hornej vyšší. Vrchná časť gélu bola zaliatá lepiacim 0% géloom. Nakoniec bol navrch umiestnený hrebeň pre vytvorenie jamiek v géle. Gél bol ponechaný dve hodiny tuhnutiu.

Jamky pripraveného gélu boli prepláchnuté destilovanou vodou kvôli odstráneniu zvyškov akrylamidov a gél bol vložený do elektroforetickej vane obsahujúcej 7 litrov 1x TAE pufru .

Po vytemperovaní elektroforetického gélu a pufru na 60°C boli do jamiek nanosené vzorky PCR produktov (10 µl vzorky a 3 µl bromfenolovej modrej). Separácia prebiehala za napätia 110 V, prúdu 140 mA po dobu 12 hodín. Po skončení denaturačnej gradientovej gelovej elektroforézy bol polyakrylamidový gél premiestnený do lázne obsahujúcej 250 ml 1xTAE pufru a farbený pomocou 50 µl etidiumbromidu o koncentrácii 10 mg/ml po dobu 20 minút. Gél bol bo odfarbení premytý destilovanou vodou a vizualizovaný pod UV žiarením.



Obr.7. *DGGE aparátúra*

#### 4.3.7 Sekvenovanie

Prečistené PCR produkty boli poslané ku komerčnému sekvenovaniu prevedenému firmou SEQme s.r.o.. Získané výsledky boli získané vo formáte FASTA a vyhodnotené pomocou služby BLAST databáze National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### 4.4 Kultivačné metódy

#### 4.4.1 Selektčné testy

Prvým krokom bola príprava sterilného materiálu a médií pre kvasinky. Médium o zložení v Tab. 7 bolo sterilizované v tlakovom hrnci po dobu 1 hodiny. Z Petriho misiek po 24 hodinovej kultivácii bolo do 5 ml vysterilizovaného média zaočkovaných po jednej kľučke príslušnej kultúry kvasiniek. Kultúry boli ponechané kultivácii na trepačke pri 120 rpm, pri stálom osvetlení pri teplote 23°C. Po 24 hodinách bola časť kultúry preliata do skúmaviek typu Eppendorf a následne bolo zmeraná absorbancia pri 600 nm pri vhodnom riedení tak, aby absorbancia nepresiahla hodnotu 1. Kvasinky boli taktiež pozorované pod mikroskopom pre vylúčenie nožnej kontaminácie. Kultúry kvasiniek boli následne nariedené tak, aby absorbancia zodpovedala hodnote 1, zcentrifugované 1 minútu pri 14 000 otáčkach za minútu. Supernatant bol odliaty a k sedimentu bolo pridaných 1 ml sterilnej vody. Následne bola opakované centrifugácia, supernatant bol odliaty a k sedimentu bol pridaný 1 ml vysterilizovanej destilovanej vody. Takto pripravená kultúra kvasiniek bola ďalej riedená 10x, 100x, 1 000x a 10 000x.

Boli pripravené dve sady tuhých médií pre realizáciu „drop“. Jedna sada obsahovala prídavok vitamínov, druhá sada bola bez prídavku vitamínov. Zloženie médií pre obe sady misiek sú uvedené v Tab. 5.

Tab. 5. Zloženie médií pre selekčný test

| Použité chemikálie                              | Misky                 |                     |
|---|-----------------------|---------------------|
|   | Bez vitamínov (20 ml) | S vitamínmi (20 ml) |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 4 g/l                 | -                   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 4 g/l                 | 2 g/l               |
| MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O           | 0,696 g/l             | -                   |
| Agar  | 30 g/l                | 30 g/l              |
| Yeast Nitrogen base                             | -                     | 1,33 ml             |

Obe sady obsahovali substráty 0,5% (w/w) D-glukózu, D-xylózu, laktózu, D-arabinózu, glycerol, škrob, manózu, galaktózu, syrovátku a boli pripravené aj sady bez substrátov. Po sterilizácii bolo do jednej sady pridaných 1,33 ml vitamínov (Yeast Nitrogen base without Amino Acids) rozpustených vo vode a sterilne prefiltrovaných. Podľa príslušného vzoru uvedeného ako na Obr.8 , boli napipetované 3 µl riedenej kultúry kvasiniek.

| Riedenie | Označenie kvasinky |   |   |   |   |   |   |   |
|----------|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|
|          | 21                 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 1 |
| 1x       | ●                  | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 10x      | ●                  | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 100x     | ●                  | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 1 000x   | ●                  | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 10 000x  | ●                  | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |

Obr.8. Spôsob označenia miest na pipetovanie pre selekčný test

#### 4.4.2 Kultivácia karotenogénnych kmeňov kvasiniek

Vybrané kmene kvasiniek sa radia medzi striktno aeróbne a mezofilné mikroorganizmy, ktoré majú podobné nároky na rastové podmienky.

Kmene kvasiniek boli kultivované v tekutom médiu pri teplote 23°C za neustáleho trepania (120 rpm) a osvetlenia z dôvodu produkcie karotenoidov. Média boli sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu jednej hodiny. Kultivácia prebiehala v troch fázach.

#### 4.4.3 Zloženie kultivačných médií

Vopred boli pripravené Petriho misky s čerstvou kultúrou vybraných druhov kvasiniek. Pre každý druh kvasiniek bolo pripravené jedno inokulum I o zložení uvedenom v Tab. 6. Vysterilizované inokulum bolo zaočkované jedným očkom čerstvej zásobnej kultúry uchováanej na Petriho miske. Kultivácia prebiehala 24 hodín v 25 ml inokula I v 100 ml Erlenmayerových bankách.

Tab. 6. Zloženie inokula I

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Zložka              | Množstvo |
| Voda                | 1000 ml  |
| Glukóza             | 20 g     |
| Pepton              | 20 g     |
| Kvasničný autolyzát | 10 g     |

Pre každý druh kvasiniek bolo po kultivácii v inokule I pripravené inokulum II, ktoré sa líšilo v zložení. Zloženie Inokula II je uvedené v Tab. 7. Vysterilované Inokulum II bolo zaočkované inokulum I, na základe premeranej absorbancie zo zaočkovaného inokula I tak, aby výsledná absorbancia média bola 0,5. Kultivácia prebiehala 24 hodín v 50 ml inokula II v 250 ml Erlenmayerových bankách.

Tab. 7. Zloženie Inokula II

| Zložka                                    | Množstvo |
|---|----------|
| Voda                                      | 1000 ml  |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 4 g      |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 4 g      |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,696 g  |
| Glukóza                                   | 30 g     |
| Kvasničný autolyzát                       | 7 g      |

Pre každý druh kvasiniek z inokula II boli pripravené dve série sterilných produkčných médií (A a B), do ktorých boli preočkované kultúry z inokula II. Zloženie produkčného média je uvedené v Tab. 8. Vysterilizované produkčné médium bolo zaočkované inokulum II na základe premeranej absorbancie zo zaočkovaného inokula II tak, aby výsledná absorbancia média bola 0,5. Kultivácia prebiehala po dobu 72 hodín v 125 ml tohoto média v 500 ml Erlenmayerových bankách.

Tab. 8. Zloženie produkčného média

| Zložka                                    | Množstvo |
|---|----------|
| Voda                                      | 1000 ml  |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 2,8 g    |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 4 g      |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,696 g  |
| Glukóza                                   | 30 g     |
| Kvasničný autolyzát                       | 1,5 g    |

#### 4.4.4 Mikroskopické pozorovanie buniek

Pre posúdenie morfológie buniek a pre vylúčenie novej kontaminácie boli kultúry kvasiniek pozorované pod mikroskopom. Kvapka suspenzie bola nanosená na podložné sklíčko, prekrytá krycím sklíčkom a kvasinky boli pozorované pod mikroskopom. Výsledky boli zachytené digitálnou kamerou a spracované počítačovým softwarom.

#### 4.4.5 Stanovenie biomasy

Rastové krivky boli stanovené pre všetky kmene rovnako nasledujúcim spôsobom. Po zaočkovaní produkčných médií boli odobraté 3 ml vzorky v čase 24, 48, a 72 hodín. Vzorky boli zcentrifugované pri 4500 otáčkach za minútu po dobu 8 minút. Následne bol odstránený supernatant a vzniknutá biomasa bola dvakrát premytá 3 ml destilovanej vody a znovu centrifugovaná. Takto premytá biomasa bola rozsuspendovaná v 3 ml destilovanej vody, preliata do vopred vysušených a zvážených váženiek a následne umiestnená do sušiarne vyhriatej na 80°C po dobu 72 hodín. Potom boli váženky prenesené do exikátoru a po 24 hodinách zvážené. Taktiež bol odobratý 1 ml vzorky, a to vždy v čase 24, 32, 48, 56



a 72 hodín, ktorý bol vhodne nariadený a použitý na spektrofotometrické stanovenie pri vlnovej dĺžke 600 nm. Ako blank bola použitá destilovaná voda.

#### 4.4.6 Spracovanie biomasy

Z produkčného média bolo odobratých 10 ml vzorky v čase 72 hodín. Vzorky boli centrifugované pri 7000 otáčkach za minútu po dobu 4 minút. Biomasa bola následne uložená do mrazničky. Lepší prehľad odberov je v Tab. 9

Tab. 9. Prehľad času vykonaných odberov

| Druh odberu                                  | Čas odberu (h) |    |    |    |    |
|--|----------------|----|----|----|----|
|  | 24             | 32 | 48 | 56 | 72 |
| OD   | √              | √  | √  | √  | √  |
| Glukóza                                      | √              | √  | √  | √  | √  |
| Gravimetrické stanovenie biomasy             | √              | x  | √  | x  | √  |
| Biomasa na stanovenie lipidov a karotenoidov | x              | x  | x  | x  | √  |

#### 4.4.7 Stanovenie glukózy

Na stanovenie glukózy bol použitý supernatant zo zcentrifugovanej biomasy kvasiniek z každého odberu .

Redukujúce sacharidy boli stanovené spektrofotometricky metódou Somogyi-Nelsona. Táto metóda využíva schopnosti redukujúcich sacharidov vyredukovať z alkalického prostredia meďnatých solí oxid meďný, ktorý s arzenomolybdenanovým činidlom poskytuje farebný komplex. Toto zafarbenie bolo zmerané pomocou UV VIS spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 720 nm proti blanku.

Substrát bol pripravený nasledujúcim spôsobom. K 1 ml vhodne nariadenej vzorky bolo pridaných 500 µl Somogyiho činidla I a 500 µl činidla II. Takto pripravené skúmavky boli ponorené do horúcej vodnej lázne po dobu 10 minút. Po 10 minútach bolo k ochladeným skúmavkám pridaných 500 µl ml činidla III, obsah bol premiešaný do rozpustenia zrazeniny. K obsahu bolo pridaných 7,5 ml vody (celkový objem bol 10 ml). Absorbancia sa merala proti blanku, ktorý bol pripravený rovnako ako vzorky, ale supernatant bol nahradený 1 ml destilovanej vody.

##### 4.4.7.1 Príprava činidiel

Roztok I pozostával z 24 g bezvodého Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 16 g NaHCO<sub>3</sub>, 144 g bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12 g vínanu sodno-draselného a 800 ml destilovanej vody.

Roztok II pozostával zo 4 g CuSO<sub>4</sub> .5H<sub>2</sub>O, 24 g bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 200 ml destilovanej vody.

Roztok III pozostával z 25 g molybdenanu amonného rozpusteného v 450 ml destilovanej vody, 21 ml koncentrovanej H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 3 g Na<sub>2</sub>HASO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O rozpusteného v 25 ml destilovanej vody. Tento roztok musel 48 hodín stáť pri laboratórnej teplote bez prístupu svetla.

##### 4.4.7.2 Stanovenie kalibračnej krivky glukózy

Pre zostrojenie kalibračnej krivky glukózy bol použitý základný roztok glukózy o koncentrácii 35g/l. Z tohto roztoku bola pripravená kalibračná rada o koncentrácii 30; 25; 20; 15; 10; 5; 2,5; a 1 g/l. Roztoky glukózy boli následne boli 100x zriedené. Do skúmaviek typu Eppendorf bolo napipetovaných 900 µl destilovanej vody a 100 µl glukózy. Z takto

nariedených skúmaviek bolo odobraných 100 µl vzorky, ktorá bola prevedená do skúmavky. Bolo pridaných 900 µl vody 500 µl Somogyiho činidla I a 500 µl Somogyiho činidla II. Skúmavky boli 10 minút povarené a ochladené na laboratórnu teplotu. Následne bolo pridaných 500 µl činidla III. Obsah skúmaviek bol doplnený 7,5 ml destilovanej vody na celkový objem 10 ml, premiešaný a následne bola na zmeraná absorbanca pomocou UV VIS spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 720 nm proti blanku (blank obsahoval namiesto vzorky 1ml destilovanej vody).

#### 4.4.8 Izolácia a analýza karotenoidov a vybraných lipidických látok

Karotenoidy, ergosterol a koenzým Q sú súčasťou lipidickej frakcie bunky. Jednou z metód ich spoločnej extrakcie je metóda podľa Folcha. Nakoniec sú vzorky karotenoidov analyzované pomocou RP-HPLC s PDA detekciou a vzorky lipidov enzymaticky pomocou ELISA readru.

##### 4.4.8.1 Extrakcia karotenoidov a lipidických látok z kvasiniek

K zmrazenej biomase kvasiniek (zo 72. hodiny) boli pridané 2 ml sklenených guľčiek a 10 ml rozpúšťadla chloroform: methanol (roztok I) v pomere 2:1. Vzorky boli extrahované po dobu 30 min na najvyššej rýchlosti. Po zvortexovaní boli pridané 2 ml 0,034% roztoku chloridu horečnatého a vzorky boli znovu vortexované po dobu 10 minút. Následne boli vzorky centrifugované vo vopred vychladenej centrifúge na 4°C pri 10 000 ot/min po dobu 5 minút. Vrchná fáza bola odstránená pomocou vákuovej vývevy a odsávacej banky. Ku zvyšnej organickej fáze boli pridané 4 ml roztoku methanol:voda:chloroform (roztok II) v pomere 48:47:3 a vzorky boli dôkladne zvortexované. Následne boli vzorky opäť zcentrifugované a bola odstránená vrchná fáza rovnako ako predošlým spôsobom. Organická fáza bola prevedená do sklenených skúmaviek pomocou pipety a zvyšky biomasy a sklenených guľčiek boli premyté 4 ml roztokom I a 2,5 ml roztokom II. Po dôkladnom zvortexovaní boli vzorky sцентрифugované, vrchná fáza bola odstránená a organická fáza bola odobratá rovnako ako predchádzajúcim spôsobom. Získaná organická fáza bola rozdelená na dve polovice a preliata do plastových skúmaviek. Z jednej sady bol stanovený obsah lipidických látok, z druhej bol stanovený obsah karotenoidov.

##### 4.4.8.2 Analýza karotenoidov metódou RP-HPLC/PDA

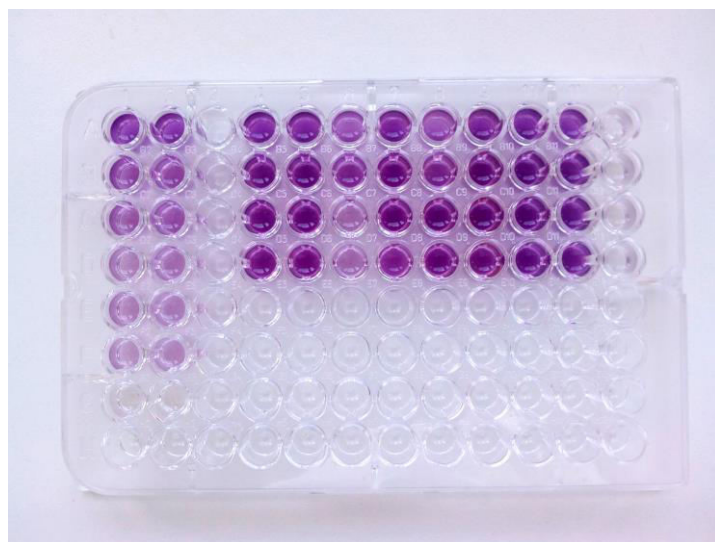
Vzorky boli prevedené do odparovacej banky a po odparení boli rozpustené v 1 ml chloroformu pre HPLC. Vzorky boli zfiltrované cez 0,2 µm filter pomocou striekačky a nanosené na nepolárnu chromatografickú kolónu C18 s predradenou predkolónou. Ako mobilné fázy boli použité fáza A o zložení acetonitril:methanol:Tris-HCl (pH 8) v pomere 84:2:14 a fáza B o zložení ethylacetát a methanol v pomere 40:60. HPLC prebiehala podľa nasledujúceho gradientu: 0 min. 100% fáza A, do 11 min. sa vymení za 100% fázou B, tá sa drží 6 minút, následne sa za minútu vymení na 100% A a od 18 do 23 min. ide čistá fáza A. Prietok bol nastavený na 1000 µl. Samotná separácia vzorky prebiehala pri 25°C po dobu 23 minút pomocou gradientovej elúcie. K detekcii bol použitý PDA detektor. Výhodou je, že sníma absorbančiu pri niekoľkých nastavených vlnových dĺžkach (450 nm pre karotenoidy a 285 nm pre ergosterol a koenzým Q), a zároveň umožní snímať aj celé absorbné vlnové spektrum. Výsledné dáta boli spracované a vyhodnotené na základe kalibračnej krivky ergosterolu a β-karoténu.

#### 4.4.8.3 Enzymatické stanovenie lipidov

Stanovenie lipidov je založené na štiepení triacylglycerolov (TAG) lipázou, pričom vzniká glycerol ktorý je oxidovaný za vzniku peroxidu vodíka a v reakcii s 4-aminoantipyrínom a *N*-etyl-*N*-(3-sulfopropyl) *m*-anisidinom sodným dáva sfarbenie, ktoré ma absorpčné maximum pri 540 nm.

Najprv bol zmiešaný Free Glycerol reagent so 40 ml vody a Triglyceride reagent s 10 ml vody. Následne bol pripravený pracovný roztok ich vzájomným zmišaním v pomere 4:1 Bola pripravená kalibračná rada štandardov pomocou Glycerol standard solution s riedením 1-6x.

Do jamiek určených pre blank a ku vzorkám bolo pridaných 10  $\mu$ l vody a 200  $\mu$ l reakčnej zmesi. Do jamiek určených pre štandard bolo pridaných 10  $\mu$ l štandardu a 200  $\mu$ l reakčnej zmesi. Následne bola doštička umiestnená do ELISA readeru temperovaného na 37 °C a bola zmeraná absorbancia pri 520 nm. Absorbancia bola sledovaná každých 5 minút po dobu 60 minút a bola odčítaná v čase najvyššej absorbancie pre danú vzorku a štandard.



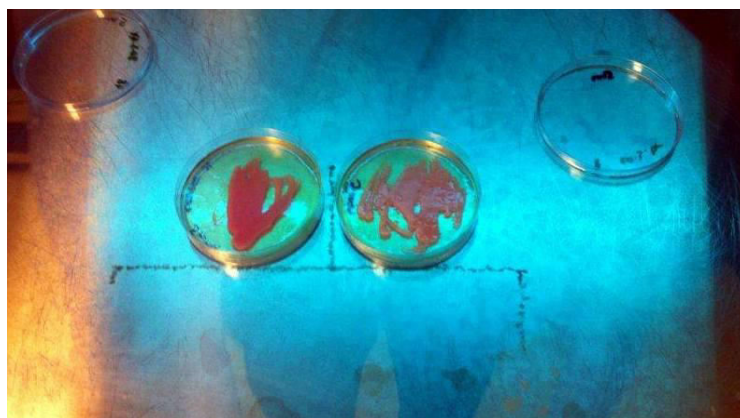
Obr.9. Doštička po enzymatickom stanovení lipidov

#### 4.5 Kultivácia mutantných kmeňov

Pre mutagenézu bol vybraný kmeň *Cystofilobasidium capitatum* (č.8), a to na základe predchádzajúcich štúdií, kde vykazoval dobré produkčné vlastnosti na odpadnom glycerole ako základom zdroji uhlíka [63].

Petriho misky boli kultivované 48 hodín pri stálom osvetlení pri teplote 23°C. Po 48 hodinovej kultivácii boli kvasinky podrobené mutácii pomocou UV žiarenia s vlnovou dĺžkou 264nm.

Bola pripravená kontrolná miska s časom 0, ktorá nebola podrobené mutácii. Na ďalšie jednotlivé misky pôsobilo žiarenie po dobu 1, 3 a 5 minút.



Obr.10. *Pôsobenie UV žiarenia ako mutagénu na Petriho misku*

Následne boli pripravené dve média z odpadných substrátov a jedno kontrolné médium obsahujúce glukózu. Ako substráty boli použité odpadná srvátka a glycerol. Zloženia médií sú uvedené v Tab. 10 a Tab. 11. Zloženie média pre glycerol odpovedá zloženiu solí pre glukózu. Rovnako bol pripravený aj roztok solí bez prítomnosti glukózy (glycerolu). Média boli sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu jednej hodiny.

Tab. 10. *Zloženie média - srvátka*

| Zložka                       | Množstvo |
|------------------------------|----------|
| Voda                         | 1000 ml  |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 1,82 g   |
| Srvátka                      | 39,2 g   |
| Kvasničný autolyzát          | 1,5 g    |

Tab. 11. *Zloženie média- glukóza a glycerol*

| Zložka                                    | Množstvo |
|---|----------|
| Voda                                      | 1000 ml  |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 4 g      |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 4 g      |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,696 g  |
| Glukóza / Glycerol                        | 30 g     |

Do Erlenmayerových baniek o objeme 100 ml bolo naliatych 20 ml vysterilizovaného média. Na Petriho misky s ožiarenou kultúrou bolo prevedených 5 ml roztoku solí, bunky boli rozsuspendované pomocou jednorazovej kľučky a prevedené do sterilnej kyvety. Z kyvety bolo 800  $\mu\text{l}$  rozsuspendovanej bunecnej kultúry prevedených do príslušných médií. Erlenmayerove banky boli zabalené do alobalu, aby sa zamedzilo prístupu svetla aby nedošlo k fotoreparácií prípadných mutácií vzniknutých UV žiarením a banky boli ponechané trepaniu 24 hodín. Po uplynutí doby boli banky odkryté a ponechané trepaniu a stálemu osvetleniu po dobu ďalších 24 hodín.

#### 4.5.1 Analýza mutantných kmeňov karotenogénnych kvasiniek

Boli pripravené média zo srvátky, glycerolu a glukózy odpovedajúce Tab. 12 a Tab. 13. Média boli sterilizované v tlakovom hrnci po dobu jednej hodiny. Po uplynutí doby boli

naliate do Petriho misky. Každý substrát pre každý čas mutácie obsahoval dve misky. Na jedno médium bolo napipetovaných 50  $\mu$ l a na druhé 100  $\mu$ l 100x nariedenej kultúry kvasiniek a kultúra bola dôkladne rozotretá pomocou hokejky. Misky boli ponechané kultivácii pri stálom osvetlení a pri teplote 23°C.

Tab. 12. Zloženie tuhého média - srvátka

| Zložka  | Množstvo |
|---|----------|
| Voda  | 1000 ml  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1,82 g   |
| Srvátka   | 39,2 g   |
| Kvasničný autolyzát                             | 1,5 g    |
| Agar  | 20 g     |

Tab. 13. Zloženie tuhého média – glukóza a glycerol

| Zložka  | Množstvo |
|---|----------|
| Voda  | 1000 ml  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 4 g      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 4 g      |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,696 g  |
| Kvasničný autolyzát                             | 1,5 g    |
| Glukóza / Glycerol                              | 30 g     |
| Agar  | 20 g     |

Množstvo srvátky bolo prepočítané na finálny obsah laktózy 30g/l.

Po kultivácii bolo na Petriho misky s príslušným substrátom nanesených 8 jednotlivých vyselektovaných kolónií s najintenzívnejším zafarbením (miska bola rozdelená na 8 častí). Kolónie boli rozotreté a misky boli ponechané kultivácii, kým kolónie dostatočne nenarastli.

Do skúmaviek bolo napipetovaných 5 ml sterilného YPD média podľa Tab. 6. Boli vybraté 4 časti, ktoré predstavovali 4 kolónie, z ktorých sa odobrala jedna kľučka kultúry a bola prepipetovaná do YPD média. Skúmavky boli ponechané kultivácii 24 hodín. Následne bolo pripravené produkčné médium o zložení podľa Tab. 8. Do Erlenmayerových baniek o objeme 100 ml bolo napipetovaných 10 ml vysterilizovaného produkčného média a také množstvo kvasiniek z YPD média, aby absorbancia zodpovedala hodnote 1. Skúmavky boli ponechané kultivácii 72 hodín.

Po kultivácii bola prevedená prietoková cytometria a boli vybrané najlepšie mutantné kolónie, ktoré boli kultivované cez dvojkrokové inokulum a po 72. hodinách kultivácie v produkčnom médiu boli stanovené metabolity a biomasa.

#### 4.6 Použitie prietokovej cytometrie

Pomocou prietokovej cytometrie bol sledovaný orientačný obsah karotenoidov a lipidov v zmutovaných kvasinkách po 72 hodinovej kultivácii. Na zistenie obsahu lipidov bolo použité fluorescenčné farbivo-nílska červeň, karotenoidy boli identifikované na základe ich autofluorescencie. K vhodne nariedeným vzorkám boli pridané 2  $\mu$ l farbiva a vzorky boli ponechané státiu 5 minút.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

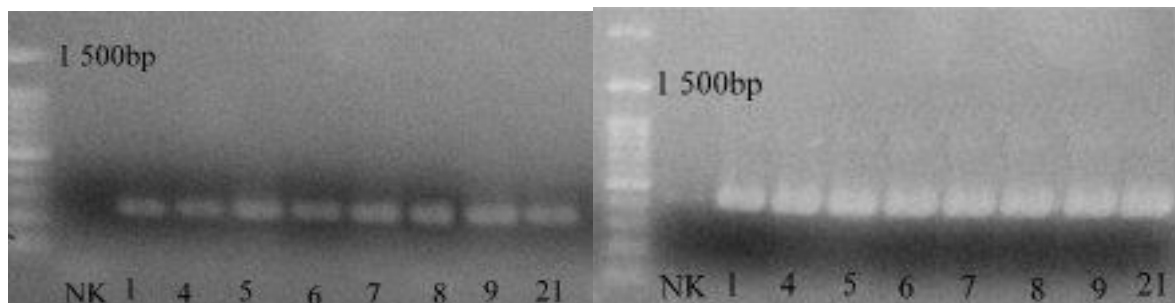
### 5.1 Molekulárna časť

#### 5.1.1 Izolácia DNA, PCR a gélová elektroforéza

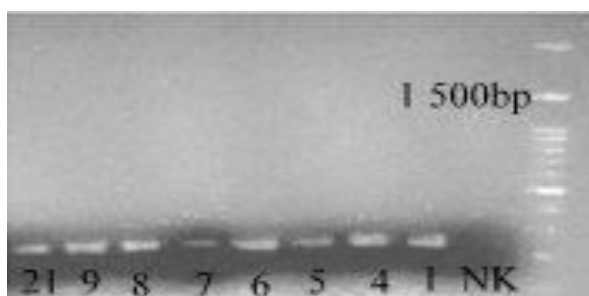
Pre overenie úspešnej izolácie DNA z karotenogénnych kvasiniek bola použitá gélová elektroforéza. Na základe spektrofotometrického premerania koncentrácie a čistoty bola DNA vhodne nariadená a prečistená.

Pre vyššiu citlivosť a vyšší výťažok bola zvolená modifikácia polymerázovej reťazovej reakcie. Modifikácia PCR, ktorá využíva vonkajšie a vnútorné primery, sa nazýva “nested” PCR. Využíva sa pri identifikácii a taxonomickom zaradení kvasiniek, kde sú amplifikované hypervariabilné oblasti DNA, a to ITS1, ITS2 a oblasť veľkej ribozomálnej jednotky (26S) D1/D2. Amplifikácia sa uskutočňuje v dvoch krokoch. Prvý krok zahŕňa cykly s využitím vonkajších primerov. V prvom kroku boli použité primery ITS1 a NL4. Produkt prvého kroku je prevedený do novej skúmavky pre druhý amplifikačný krok s vnútornými primermi. Každý úsek rDNA vyžadoval pro amplifikáciu vlastnú sadu vnútorných primerov. ITS1 oblasť bola amplifikovaná primermi ITS1-GC a ITS2, ITS2 oblasť bola amplifikovaná primermi ITS3 a ITS4-GC a D1/D2 oblasť veľkej ribozomálnej jednotky rDNA bola naamplifikovaná primermi NL1 a LS2. Primery obsahujú GC svorky pre lepšie rozlíšenie pri analýze PCR produktou DGGE.

Z Obr.11, a Obr.12 je patrné, že ITS oblasť vybraných druhov karotenogénnych druhov kvasiniek je približne 250bp, 5,8S-ITS2 je približne 450 bp a D1/D2 približne 280 bp.



Obr.11. Z ľava oblasť ITS1 rDNA a 5,8S-ITS2 rDNA vybraných karotenogénnych kvasiniek



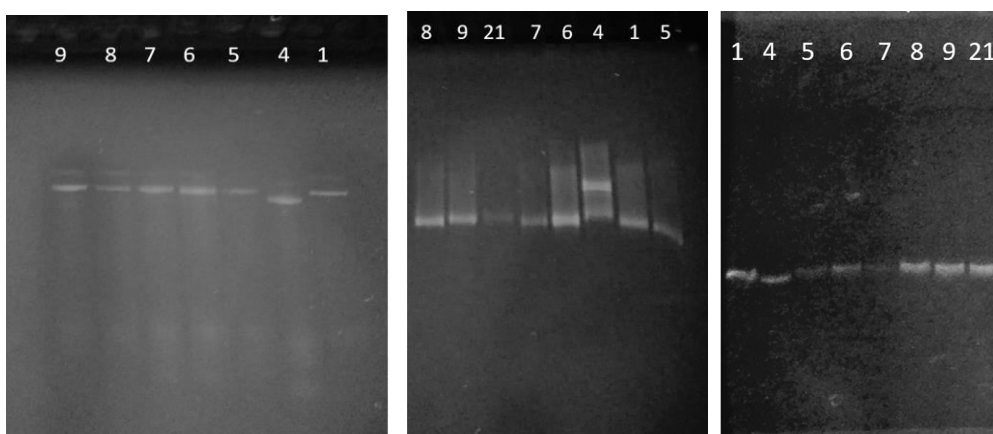
Obr.12. Oblasť D1/D2 rDNA vybraných karotenogénnych kvasiniek

### 5.1.2 DGGE

DGGE je metóda umožňujúca rozlíšiť rozdiely v sekvencii DNA a preto je vhodná ako metóda “finger printu” pre identifikáciu jednotlivých druhov mikroorganizmov. Jej nevýhodou je, že je možné ju aplikovať iba pre sekvencie do veľkosti 500 bp, a preto bola táto analýza prevedená iba pre jednotlivé úseky rDNA zvlášť -pre ITS1, 5,8S-ITS2 rDNA a D1/D2 .

Všetky karotenogénne kmene kvasiniek boli podrobené DGGE. Pre ITS1 oblasti kvasinkovej DNA bol použitý denaturačný gradient 60 – 80 %, pre ITS2 50 – 70 % a pre D1/D2 a 50 – 80 %.

Na nižšie uvedených obrázkoch sa nachádzajú výsledky analýzy. Ako je možné vidieť, medzi kmeňmi karotenogénnych kvasiniek sa nachádzajú odlišnosti iba u kvasinky č.4 (*Rhodotorula mucilaginosa*). Je to v dôsledku blízkej príbuznosti zvyšných kmeňov. Tento rozdiel je viditeľný v prípadoch úsekov rDNA ITS1, 5,8-ITS2 aj D1/D2.



Obr.13. Zľava oblasť ITS1, 5,8S-ITS2 rDNA, D1/D2 rDNA vybraných karotenogénnych kvasiniek (číslovanie kmeňov vid' Tab. 1)

### 5.1.3 Sekvenovanie oblasti ITS1-5,8S-ITS2 a D1/D2

Pomocou primerov ITS1 a NLS bola amplifikovaná sekvencia rDNA. Prečistené PCR produkty boli poslané komerčnému sekvenovaniu prevedenému firmou SEQme s.r.o.. Získané výsledky boli získané vo formáte FASTA a boli spracované pomocou služby Blast databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Pre porovnanie podobnosti sekvencií medzi karotenogénnymi kvasinkami sa využila hodnota indexu Bit Score programu Blast. Táto hodnota koreluje zhodnosť nájdenej podobnej sekvencie k celkovej dĺžke zdrojovej sekvencie a dĺžke sekvencie komparačnej, preto jej hodnota získaná z porovnania dvoch zhodných sekvencií jedinej vzorky bola využitá ako referenčná k hodnote zrovnania medzi nezhodnými sekvenciami.

Na základe identifikácie pomocou databáze NCBI sa jedná vo všetkých prípadoch o druh kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa*. Sekvenovania musia byť ale opakované vzhľadom k nízkej kvalite výsledkov, vid' Obr.14, výsledky neboli úplné v dôsledku nízkej koncentrácie DNA. Na základe vyhodnotenia gélu DGGE sa kvasinka č. 4 odlišovala, ale môže to byť spôsobené ako nízkou spoľahlivosťou sekvenovania, tak sa môže jednať o odlišnosť v rámci rovnakého druhu pre iný kmeň. Dôvodom môže byť aj nedávna taxonomická reklasifikácia. Použité kmene v laboratóriu pochádzajú z Československej zbierky mikroorganizmov z Bratislavy. V tom čase boli kvasinkové druhy identifikované na základe svojich fenotypových vlastností. Je však treba priznať, že druhy rodu *Cystofilobasidium*

sú v tejto práci pravdepodobne zaradené nesprávne, pretože ich fenotyp je pomerne charakteristický a dajú sa od ostatných rodov rozlíšiť aj mikroskopicky.

Tab. 14. Výsledky sekvenovania

|    | Pôvodný kmeň                             | Výsledok sekvenovania           |
|----|--|---------------------------------|
| 1  | <i>Rhodotorula aurantiaca</i>            | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| 4  | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>          | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| 5  | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>          | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| 6  | <i>Phaffia rhodozyma</i>                 | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| 7  | <i>Cystofilobasidium capitatum</i>       | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| 8  | <i>Cystofilobasidium capitatum</i>       | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| 9  | <i>Cystofilobasidium macerans</i>        | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| 21 | <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |

|   |      |
|---|------|
| GAGGYTGCGAATTARGACGTCCACTTAACTTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAACCCCTGTGCATTTGTTTGGGATMSTA | 80   |
| ACTCTCGCAAGAGGGCGAACTCCTATTCACTTATAAACACAMMGTCTATGAATGTATTAATTTTATAACAAAATAAAAC   | 160  |
| TTTCWRCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAACAACGCAKCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA  | 240  |
| KTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTATGAATACTT   | 320  |
| CAACCCCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTACGGTCTAGCTCGTTCTGTA  | 400  |
| TGCATTAGCATCCGCAATCKAACTTCCGGATTGACTTGGCSTARTAKACTATTCGCTGAGGAATTCTAATCTTCRGATTAS | 480  |
| AGCCGGGTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGCTACMTTTTAASATTAGATCTCAMATCAGGWAGGACTACCCG    | 560  |
| CTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAAGGATTCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAG    | 640  |
| CTCAWATTTATAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGWTTTTCKKCGTTGGACCGCACAAAST   | 720  |
| CTGTTGGAATACARCGGCATAGTGGTGAGACCCCGYATATGGWCGGACGCCAGCGCTTGYGATACRTTYTCGAAGAS     | 800  |
| TCCGAGTYGTYTGGGAATGCARCTCAAATGRGTGGTRAATTCCATCTAAGCTAAATATGGCGAGASACGATAGCGAASAAG | 880  |
| TACCRGTAGSGAAGATGATAGACWTTGGAAGAGASTGAMAKYACGTGAATTGTGGATGGAACGCTYGWMGTGCGACTGCTG | 960  |
| CCGAGCATCGTTGCAGCAKCATCWGTTTTCAGATGATAATG   | 1000 |

Obr.14. Výsledok sekvenovania karotenogénnej kvasinky č.4 (*Rhodotorula mucilaginosa*)

Ako môžeme vidieť Obr.14, medzi nukleotidmi (A,C,G,T) sa nachádzajú aj ďalšie písmená. Význam písmen je uvedený v Tab. 15. Z výsledkov sekvenácie jednoznačne vyplýva, že k presnému overeniu druhov použitých kvasiniek bude treba analýzu zopakovať s dostatočnou koncentráciou DNA.



Tab. 15. Význam symbolov vo FASTA formáte –posunout k tabulce

| Značka | Význam                        | Popis                           |
|--------|-------------------------------|---------------------------------|
| A      | A                             | Adenin                          |
| C      | C                             | Cytosin                         |
| G      | G                             | Guanin                          |
| T      | T                             | Thymin                          |
| U      | U                             | Uracil                          |
| R      | A alebo G                     | Purínové báze                   |
| Y      | C, T a alebo U                | Pyrimidinové báze               |
| K      | G, T a alebo U                | Báze obsahujúce keto- skupiny   |
| M      | A a alebo C                   | Báze obsahujúce amino- skupiny  |
| S      | C a alebo G                   | Silná interakcia                |
| W      | A, T a alebo U                | Slabá interakcia                |
| B      | nie je A (i.e. C, G, T or U)  | Nie je to Adenin                |
| D      | nie je C (i.e. A, G, T or U)  | Nie je to Cytosin               |
| H      | nie je G (i.e., A, C, T or U) | Nie je to Guanin                |
| V      | ani T ani U (i.e. A, C or G)  | Nie je to ani Thymin ani Uracil |
| N      | A C G T U                     | Akákolvek báza                  |
| X      | Vymaskovanie                  | Vymaskovanie                    |
| -      | Medzera neznámej dĺžky        | Medzera neznámej dĺžky          |

## 5.2 Fenotypová charakterizácia

### 5.2.1 Selekčné testy

Tento druh techniky je vhodný k rýchlejšej fenotypovej charakterizácii mikroorganizmov. Z výsledkov kultivácie môžeme stanoviť, či je daný druh kvasinky schopný utilizovať daný substrát. Toto stanovenie je oproti klasickým kultivačným metódam rýchlejšie a výhodou je aj menšia spotreba chemikálií.

Bol sledovaný rast karotenogénnych kvasiniek na rôznych substrátoch. Boli použité dve sady Petriho misiek. Prvá bola bez prídavku vitamínov, druhá obsahovala prídavok vitamínov. Použitými substrátmi boli glukóza, D-xylóza, D-arabinóza, laktóza, manóza, syrovátka, glycerol, škrob a médium bez substrátu. Petriho misky boli kultivované pri teplote 23°C pri stálom osvetlení po dobu 48 hodín. Značenie kvasiniek odpovedá Tab. 1.

Kvasinky boli riedené 10, 100, 1000 a 10 000x. Kvasinky boli pre lepšiu prehľadnosť zaznamenané do Tab. 16. Všetky boli porovnané s médiom bez prídavku substrátu a bola ohodnotená schopnosť utilizácie daného substrátu.

Z obrázkov je patrné, že kvasinky na médiu s prídavkom vitamínov rastú lepšie, ako na médiách bez prítomnosti vitamínov, a to vo väčšine prípadov. Výnimku tvorí glukóza, ako všeobecne najlepšie utilizovaný monosacharid, kde všetky kmene veľmi dobre rástli aj na médiu bez prídavku vitamínov. Pentózu xylózu sú kvasinky schopné dobre utilizovať aj bez prídavku vitamínov, rovnako ako hexózu manózu. Rast na týchto médiách s prídavkom vitamínu má silnú odozvu. Môžeme tvrdiť, že najlepšími médiami pre rast väčšiny karotenogénnych kvasiniek aj pri najväčšom riedení boli glukóza, D-xylóza a manóza.

Dôvodom rastu kvasiniek na médiu bez substrátu je fakt, že majú intracelulárnu zásobu energie, ako napr. lipid bodies a vitamíny.

Najslabšiu odozvu na rast kvasiniek mal škrob, z tohoto dôvodu nebol zaradený ako odpadný substrát pre sledovanie produkcie metabolitov u mutantných kmeňov. Je možné, že karotenogénne kvasinky buď neobsahujú amylázy, ktoré štiepia väzby v škrobe, alebo aktivita týchto enzýmov prebieha za iných podmienok. Slabú odozvu mal aj disacharid laktóza, ktorá je pre nich ťažšie využiteľná. Monosacharidy glukóza a galaktóza sú pre kvasinky ľahšie spracovateľné.

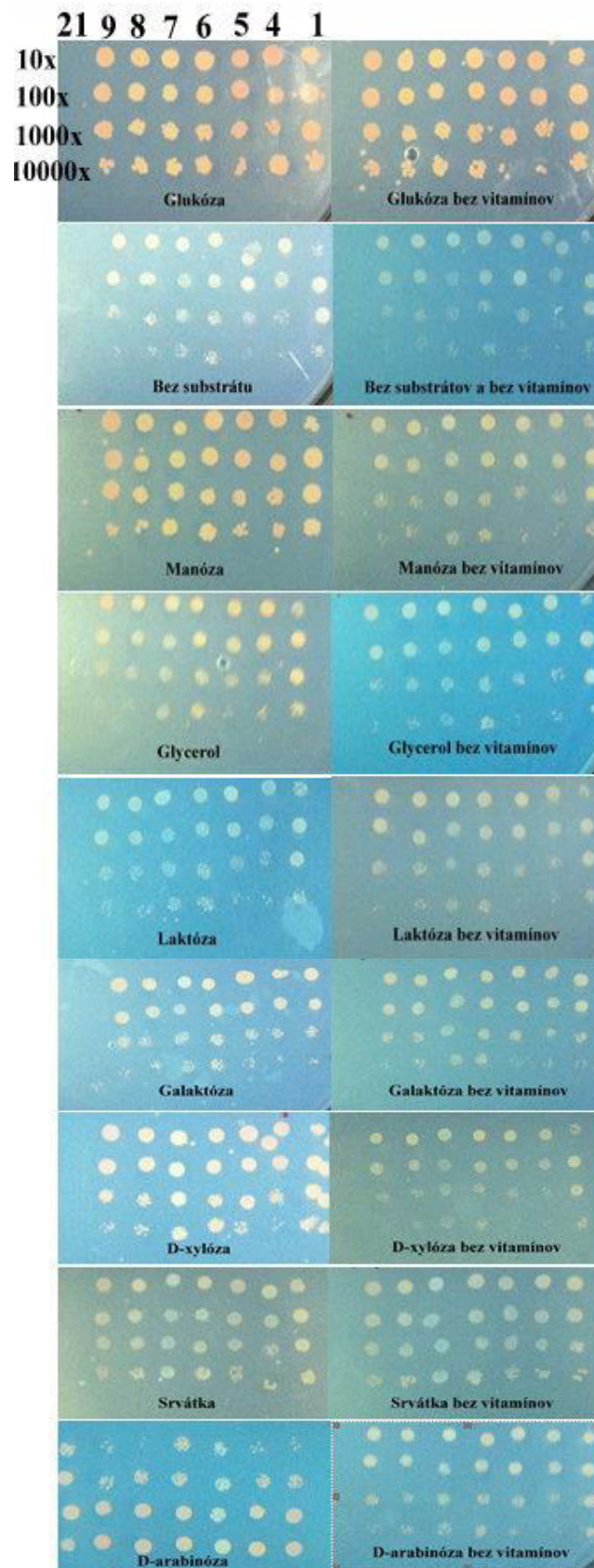
Kvasinka s číslom 21 (*Cystofilobasidium infirmominiatum*) nenarástla ani na jednom z médií. Dôvodom je že ide o psychrofilnú kvasinku.

Najlepšie rastové vlastnosti pri najväčšom riedení zaznamenali kvasinky č. 1, 6, 7 a 8. Môžu sa teda predbežne javiť ako najlepší producenti karotenoidov a lipidov a ľahko využívajú väčšinu substrátov.

Glycerol a srvátka sa využívajú najmä ako odpadné substráty. Rast na týchto dvoch médiach bol menší v porovnaní s vyššie uvedenými sacharidmi.

Tab. 16. Súhrnná tabuľka využitia substrátov jednotlivými druhmi karotenogénnych kvasiniek (-žiadny/veľmi slabý rast, +slabý/priemerný rast, ++ výborný rast)

|  | Glukóza |        | Manóza |        | Xylóza |        | Laktóza |        | Srvátka |        | Glycerol |        | Arabínóza |        | Galaktóza |        |
|--|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
|  | Bez     | S vit. | Bez    | S vit. | Bez    | S. vit | Bez     | S vit. | Bez     | S vit. | Bez      | S vit. | Bez       | S vit. | Bez       | S vit. |
| <i>Rhodotorula aurantiaca</i>            | ++      | ++     | +      | ++     | +      | ++     | -       | -      | -       | +      | -        | +      | -         | +      | -         | +      |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>          | ++      | ++     | +      | ++     | +      | ++     | -       | -      | -       | +      | -        | +      | -         | +      | -         | +      |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>          | ++      | +      | +      | ++     | +      | ++     | -       | -      | -       | +      | -        | +      | -         | -      | -         | +      |
| <i>Phaffia rhodozyma</i>                 | ++      | ++     | +      | ++     | +      | ++     | -       | -      | -       | +      | -        | +      | -         | +      | -         | +      |
| <i>Cystofilobasidium capitatum</i>       | ++      | ++     | +      | ++     | +      | ++     | -       | -      | -       | +      | -        | +      | -         | +      | -         | +      |
| <i>Cystofilobasidium capitatum</i>       | ++      | ++     | +      | ++     | +      | ++     | -       | -      | -       | +      | -        | +      | -         | +      | -         | +      |
| <i>Cystofilobasidium macerans</i>        | ++      | ++     | +      | ++     | +      | ++     | -       | -      | -       | +      | -        | +      | -         | +      | -         | -      |
| <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> | -       | -      | -      | -      | -      | -      | -       | -      | -       | -      | -        | -      | -         | -      | -         | -      |



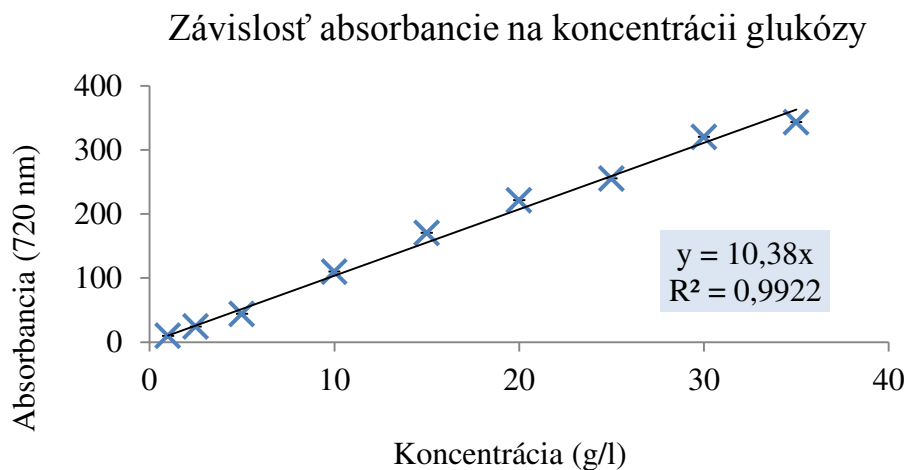
Obr.15. Selekčné testy na rôznych druhoch substrátu rôznych kmeňov karotenogénnych kvasiniek - číslovanie vid' Tab. 1 (pre všetky obrázky platí riedenie a číslovanie rovnako ako u prvého gélu vľavo hore-glukóza).

## 5.2.2 Kultivácia

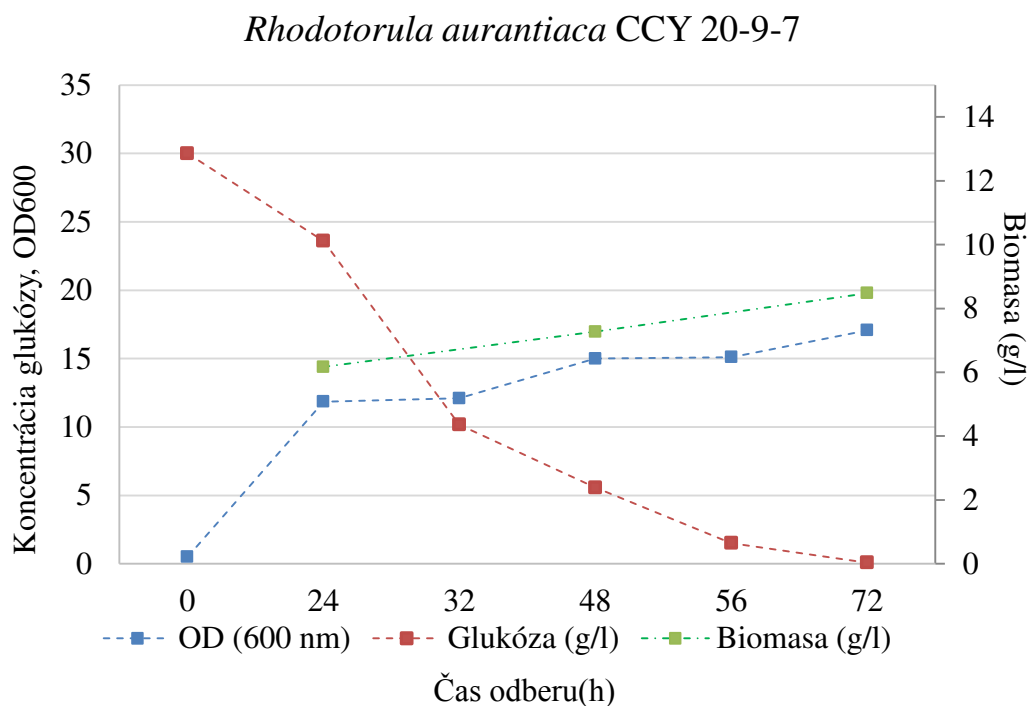
### 5.2.2.1 Rastové charakteristiky

Kvasinky boli kultivované na glukózovom médiu. Boli prevedené rastové charakteristiky jednotlivých druhov, sledovaná spotreba glukózy počas kultivácie a produkcia biomasy.

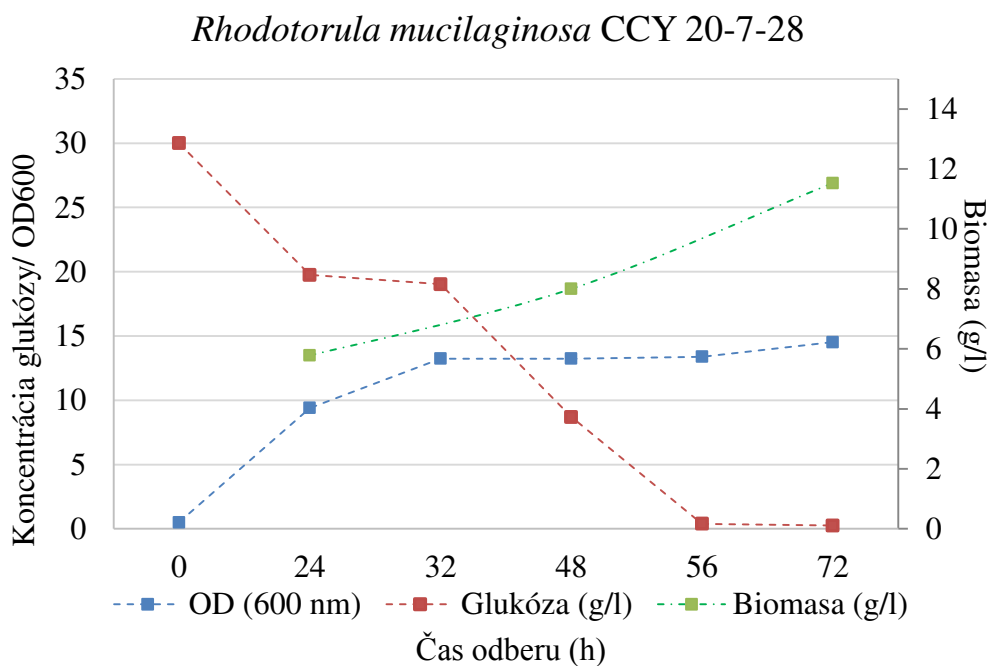
Pre sledovanie využitia glukózy v čase bolo treba zostaviť kalibračnú závislosť podľa Somogyi-Nelsona, aby mohlo byť odčítané množstvo glukózy v médiu od celkového množstva redukujúcich cukrov.



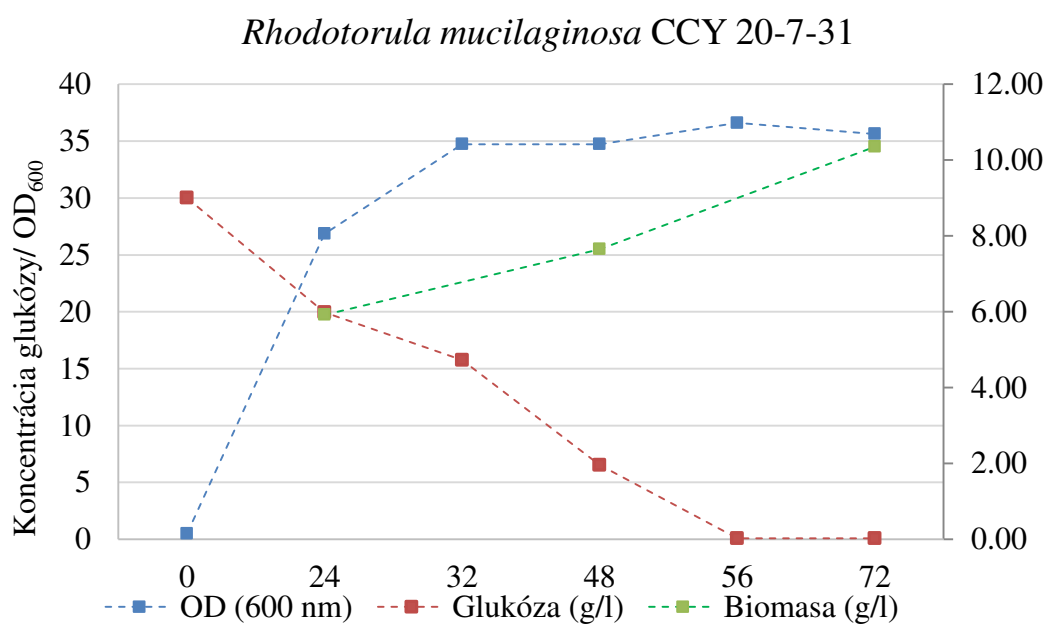
Graf č. 1 Závislosť absorbancie na koncentrácii glukózy; kalibrácia metódy Somogyi- Nelsona



Graf č. 2 Rastová krivka kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* stanovená z biomasy, OD<sub>600</sub> a využitia glukózy v závislosti na čase odberu.

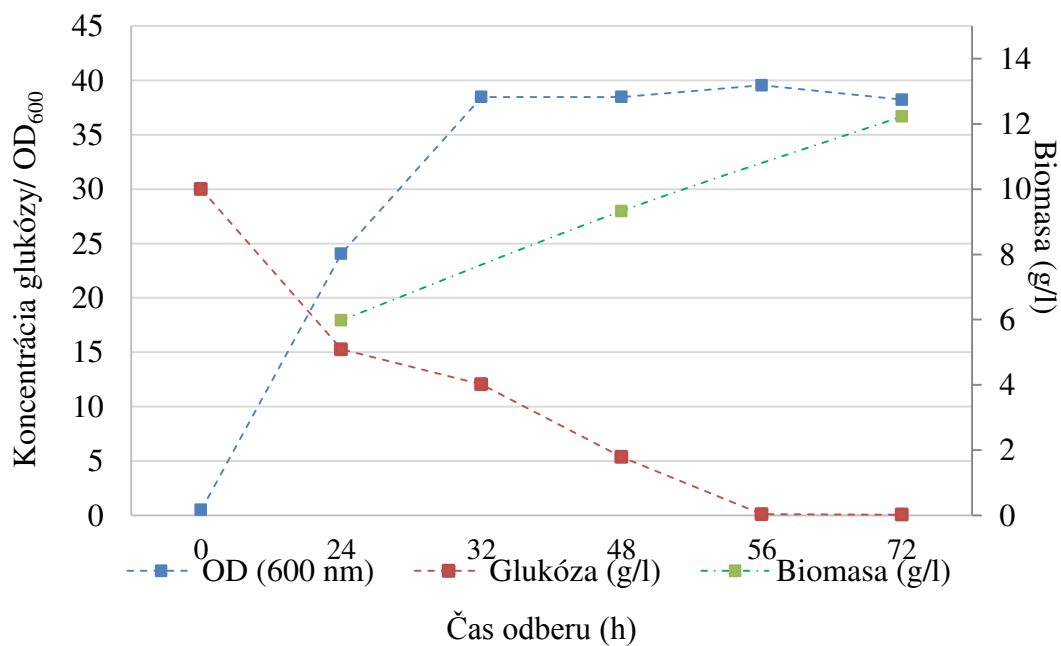


Graf č. 3 Rastová krivka kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* stanovená z biomasy,  $OD_{600}$  a využitié glukózy v závislosti na čase odberu.



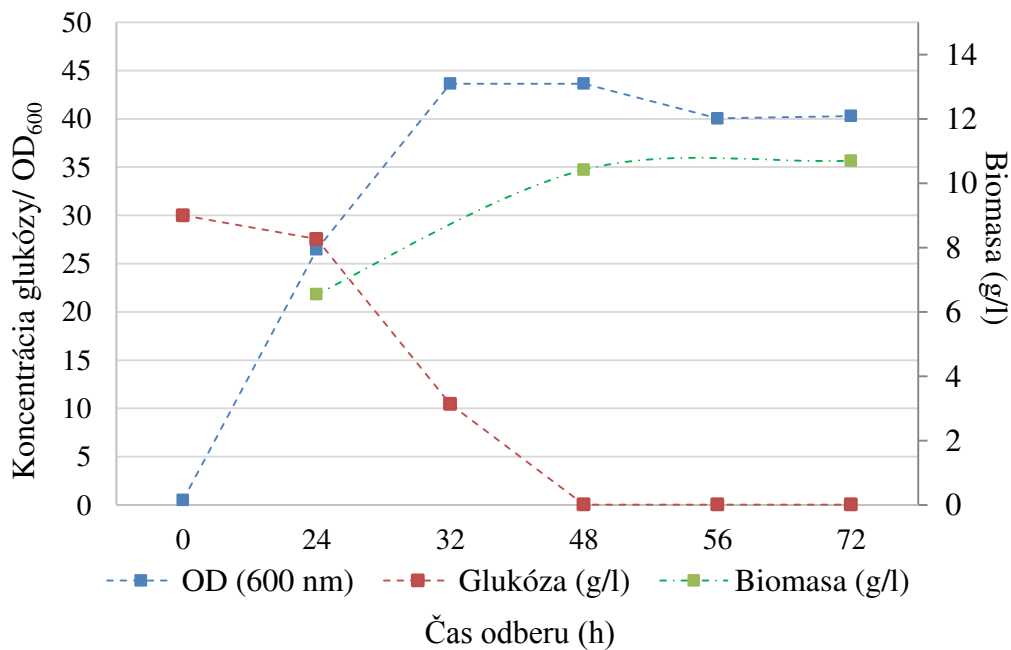
Graf č. 4 Rastová krivka kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* stanovená z biomasy,  $OD_{600}$  a využitié glukózy v závislosti na čase odberu.

*Phaffia rhodozyma* CCY 77-1

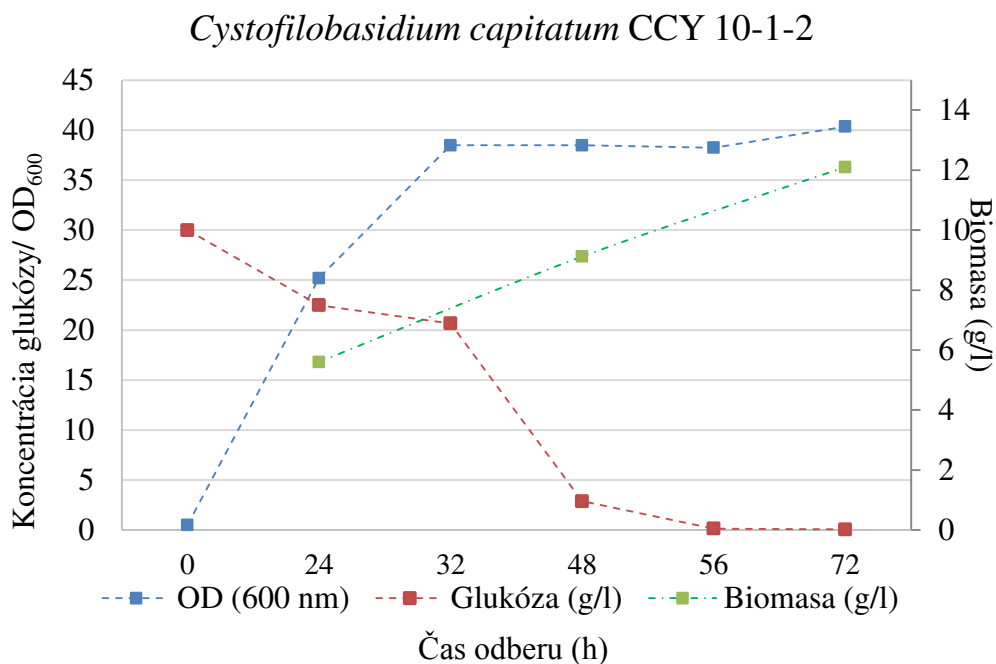


Graf č. 5 Rastová krivka kvasinky *Phaffia rhodozyma* stanovená z biomasy, OD<sub>600</sub> a využitiu glukózy v závislosti na čase odberu.

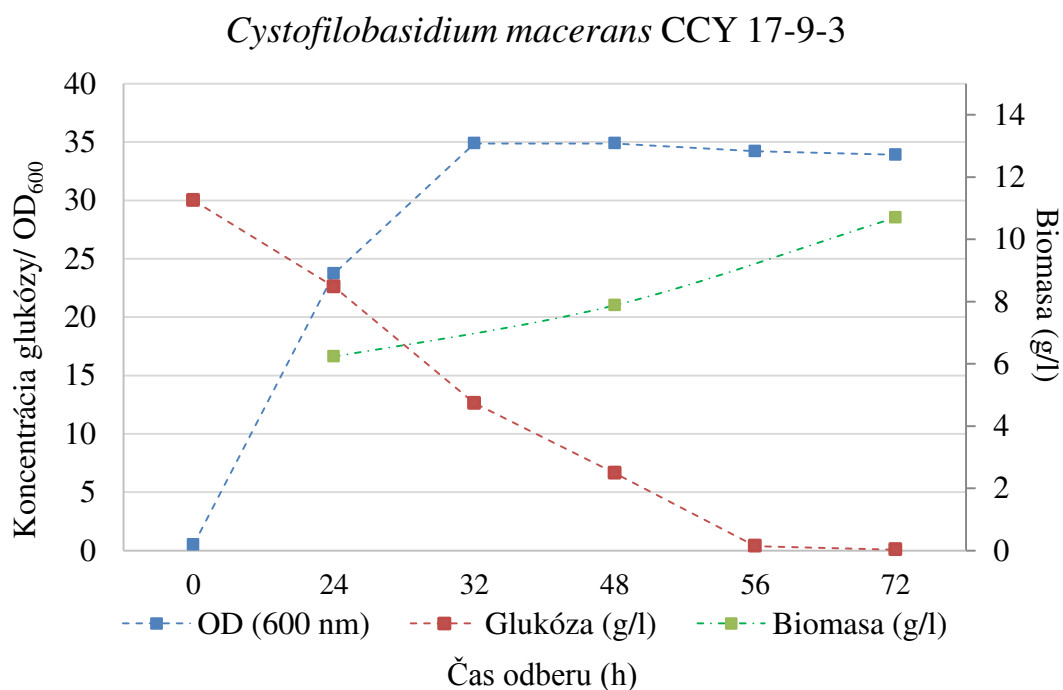
*Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1



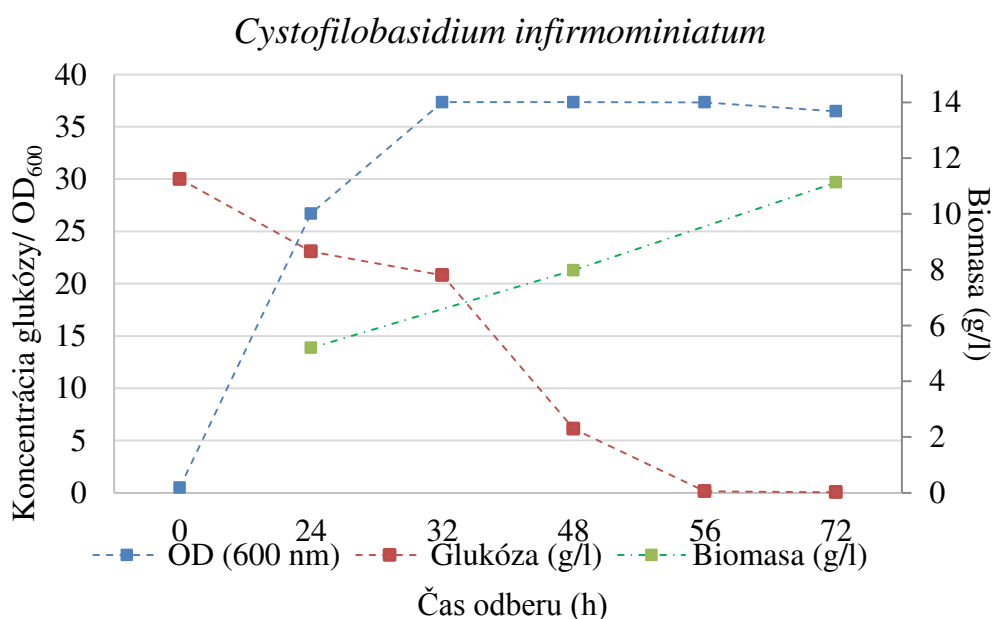
Graf č. 6 Rastová krivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* stanovená z biomasy, OD<sub>600</sub> a využitiu glukózy v závislosti na čase odberu.



Graf č. 7 Rastová krivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* stanovená z biomasy,  $OD_{600}$  a využitiu glukózy v závislosti na čase odberu.



Graf č. 8 Rastová krivka kvasinky *Cystofilobasidium macerans* stanovená z biomasy,  $OD_{600}$  a využitiu glukózy v závislosti na čase odberu.



Graf č. 9 Rastová krivka kvasinky *Cystofilobasidium infirmominiatum* stanovená z biomasy, OD<sub>600</sub> a využitia glukózy v závislosti na čase odberu.

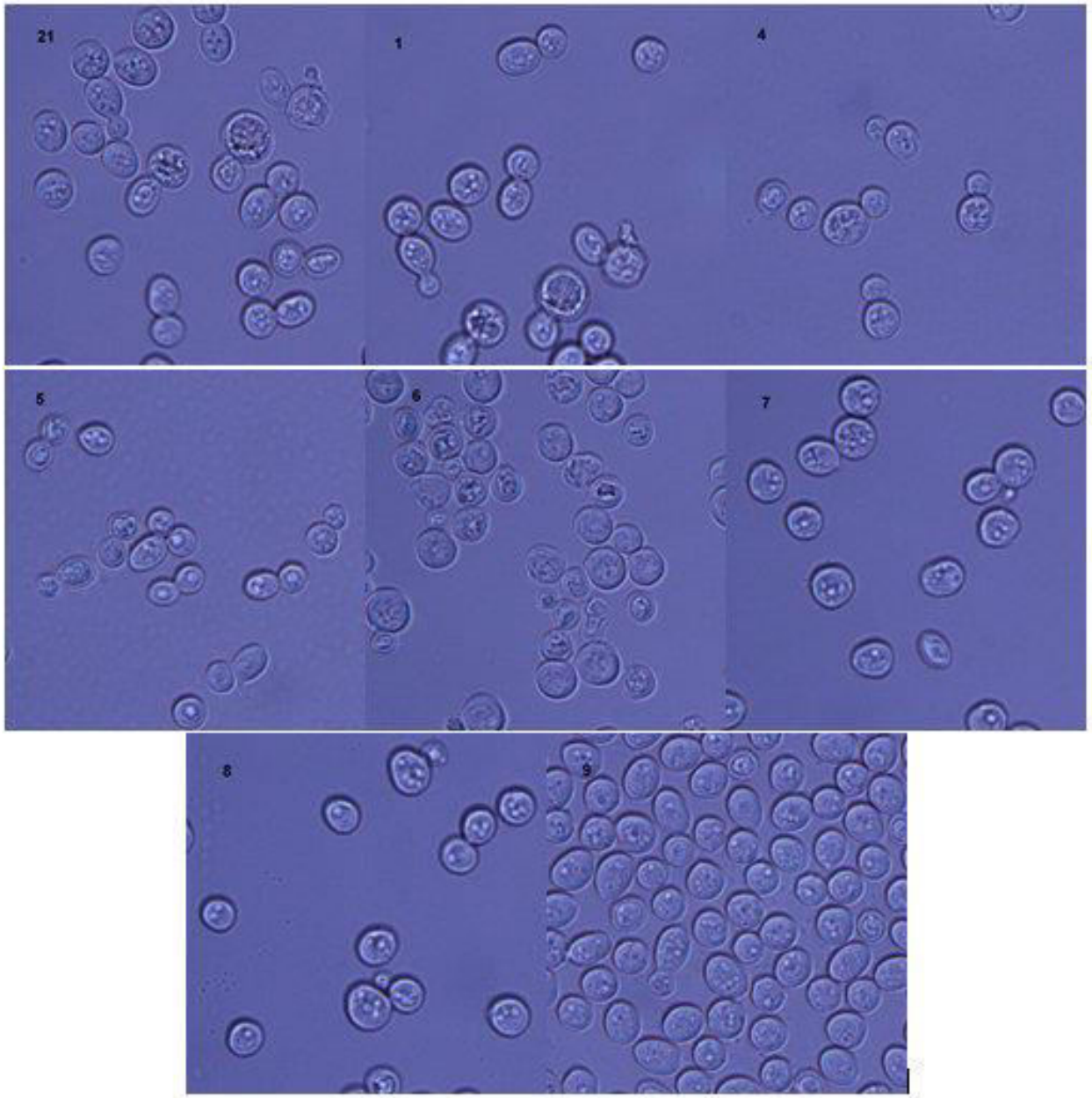
Z grafov je zrejmé, že všetky karotenogénne kvasinky kultivované na glukózovom médiu dosahujú exponenciálny stav okolo 32. hodiny a od tohto času sa rast spomalil a prešiel do stacionárnej fázy. Stacionárna fáza je predĺžená a je charakteristická nárastom biomasy a vyčerpaním glukózy ako hlavného zdroja uhlíka. V tejto fáze dochádza k akumulácii sekundárnych metabolitov a lipidov. U väčšiny kvasiniek došlo k vyčerpaniu glukózy v 56. minúte. Jediné kvasinka *Rhodotorula aurantiaca* (č.1) zaznamenala vyčerpanie až na konci kultivácie. Naopak, u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* (č.7) došlo k vyčerpaniu zdroja uhlíka už v 48. hodine.

U väčšiny kvasiniek je pozorovaný nárast biomasy aj v stacionárnom stave posúdenom na základe stanovenia optickej hustoty (OD). Hodnota OD slúži k určení koncentrácie počtu buniek v suspenzii – nerozlišuje ale živé a mŕtve bunky. Dôvodom nárastu biomasy aj po tomto čase môže byť akumulácia metabolitov, a to najmä lipidov. Kvasinka *Rhodotorula aurantiaca* (č.1) a *Rhodotorula mucilaginosa* (č.4) nedosiahli stacionárny stav podľa OD. Výnimkou v produkcii biomasy je kvasinka *Cystofilobasidium capitatum* (č.7) u ktorej biomasa stagnuje po dosiahnutí stacionárneho stavu po vyčerpaní glukózy. Z hľadiska produkcie biomasy sa najlepšimi producentami javia *Phaffia rhodozyma* (12,26 g/l) a *Cystofilobasidium capitatum* (č.7) (12,10 g/l). Najnižšiu produkciu biomasy vykazuje č.1 *Rhodotorula aurantiaca* (8,48 g/l)

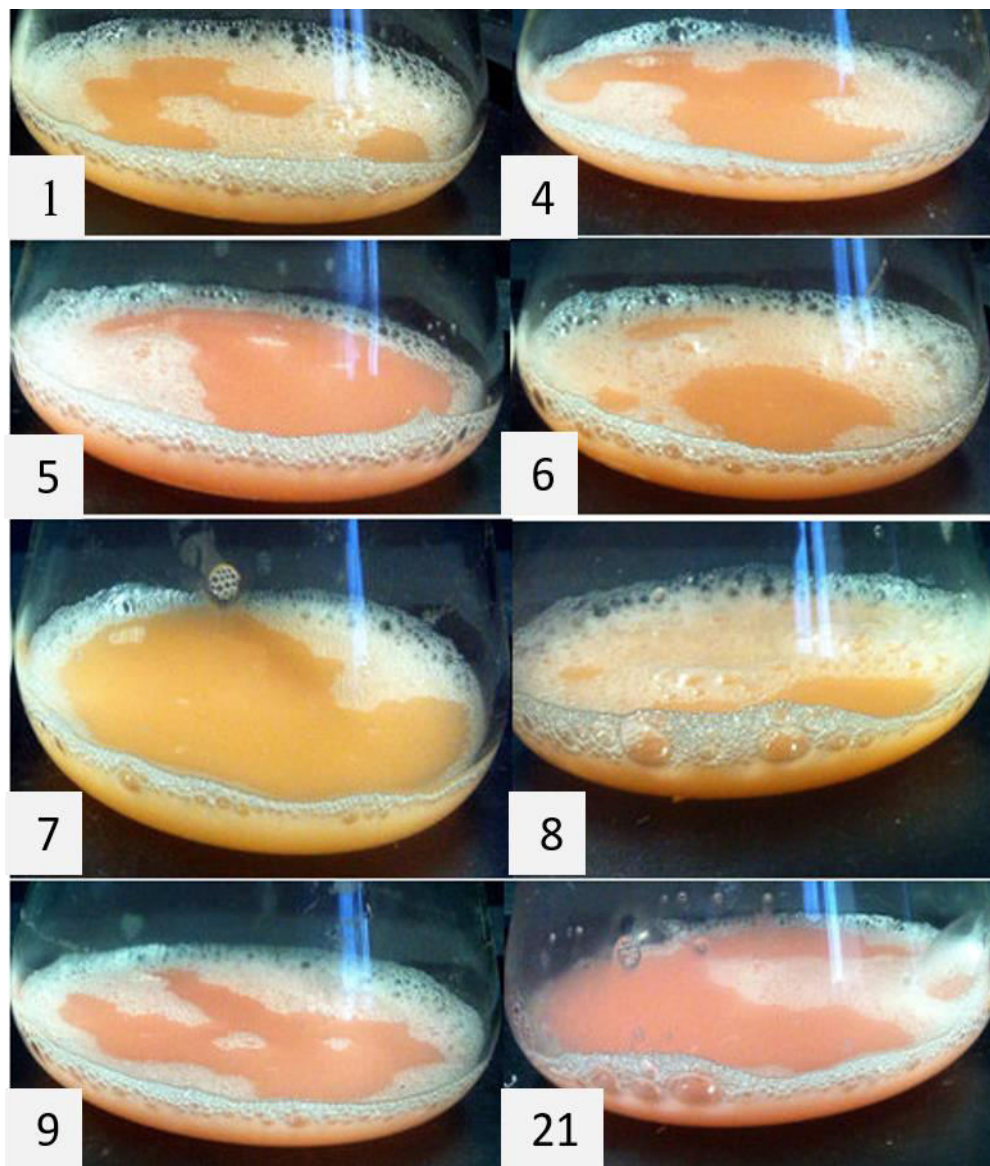
#### 5.2.2.2 Sledovanie morfológických zmien

Na Obr.16 sú zobrazené mikroskopom pozorované bunky po 72 hodinách kultivácie na glukózovom médiu. Všetky kvasinky sú rovnakej veľkosti a guľovitého tvaru. Vo všetkých bunkách kvasiniek vidieť biele miesta, ktoré môžu predstavovať orgány obsahujúce akumulované lipidy. Kontrola, či sa jedná práve o akumulované lipidy, sa robí ofarbením lipidov pomocou nílskej červene a následnou analýzou pomocou prietokovej cytometrie alebo pod fluorescenčným mikroskopom.





Obr.16. *Morfológia buniek po kultivácii na glukózovom médiu .*



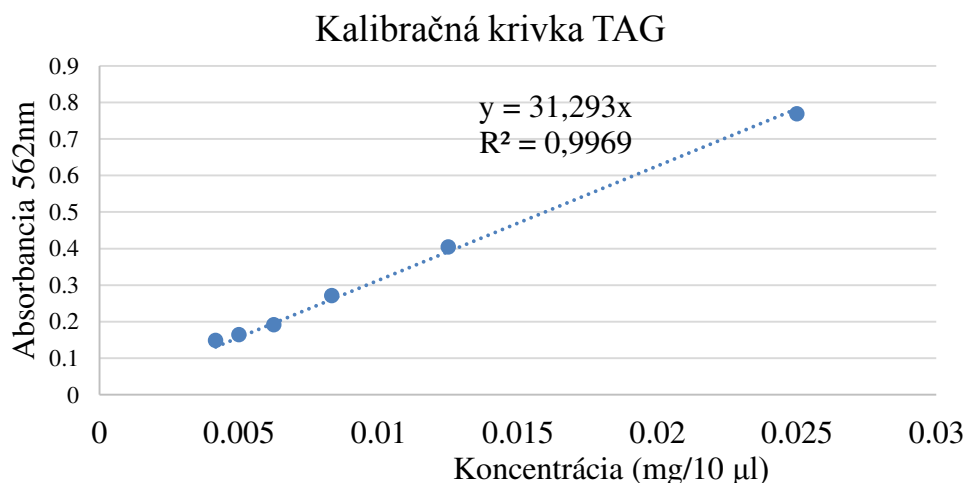
Obr.17. Sfarbenie karotenogénnych kvasiniek po 72. hodinách kultivácie (číslovanie kmeňov vid' Tab. 1)

### 5.2.2.3 Stanovenie metabolitov

Po 72. hodine kultivácií vybraných karotenogénnych kvasiniek boli sledované vybrané metabolity. Karotény boli analyzované pomocou metódy HPLC s PDA detekciou. Z hľadiska karotenoidov bola sledovaná koncentrácia  $\beta$ -karoténu. Taktiež bolo stanovené celkové množstvo ergosterolu, čo je sprievodný metabolit a je to provitamín D. Celkové karotenoidy boli vypočítané z kalibračnej rady pre  $\beta$ -karotén.

Stanovenie sa uskutočnilo v dvoch paralelných experimentoch na glukózovom médiu. Výsledky sú uvedené ako priemerná hodnota z paralelných meraní. Pred samotnou analýzou  $\beta$ -karoténu a ergosterolu boli namerané kalibračné krivky. Príslušný štandard (10 mg) bol rozpustený v 50 ml chloroformu. Z tohto zásobného roztoku bola pripravená koncentračná rada. Zo získaných plôch píkov bola zostavená kalibračná krivka, ktorá bola použitá pri výpočte karotenoidu a ergosterolu v analyzovaných vzorkách (vid' kapitola 4.4.8.22.7.1.1).

Pre enzymatické stanovenie lipidov bola vytvorená kalibračná krivka z TAG štandardu po 20. minúte inkubácie. Triacylglyceroly boli stanovené pomocou Serum Triglyceride Determination kitu obsahujúceho Triglyceride reagent a Free glycerol reagent. Stanovenie je založené na štiepení TAG lipázou za vzniku glycerolu a mastných kyselín. Stanovovaný glycerol je následne oxidovaný a po reakcii s 4-aminoantipyrinom a *N*-ethyl-*N*-(3-sulfopropyl) *m*-anisidínom sodným dáva chinoniminové farbivo, ktoré sa stanovuje spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 562nm (vid'. Kapitola 4.4.8.3).

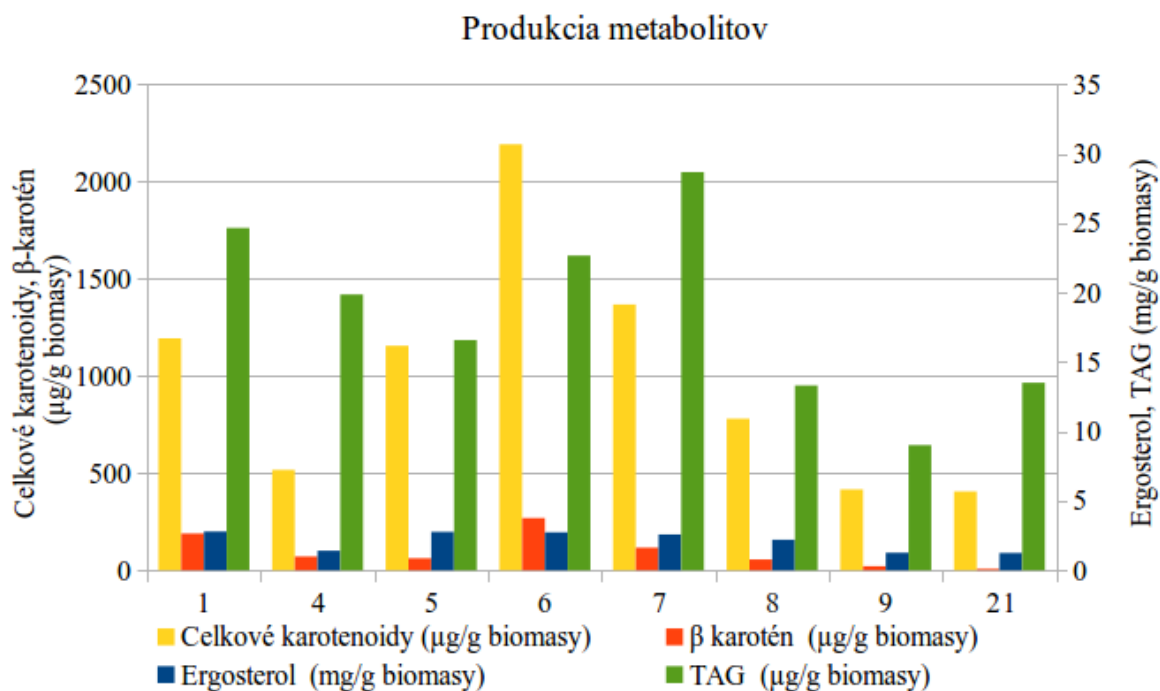


Graf č. 10 Kalibračná krivka TAG pre enzymatické stanovenie lipidov

Obsah glycerolu vo vzorkách bol vypočítaný ako podiel TAG v 5 ml kultúry a biomasy stiahnutej na 5 ml kultúry zo 72 hodiny. Koncentrácia štandardu je 2,5 mg/ml, čo odpovedá koncentrácii trioleínu 0,26 mg/ml.

Analyzované dáta karotenoidov a ergosterolu boli spracované chromatografickým softwarom X-Calibur. Ako môžeme vidieť z Graf č. 11, najvyšší obsah TAG je u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* (č.7). Vyššie hodnoty sú zaznamenané aj pre kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* (č.1) a *Phaffia rhodozyma* (č.6). Tieto kvasinky sa vyznačujú taktiež aj vyšším obsahom celkových karotenoidov. Koncentrácia  $\beta$ -karoténu je veľmi nízka. Najvyššiu hodnotu vykazuje *Phaffia rhodozyma* (č.6). Celkové množstvo v príslušných jednotkách je uvedené v Tab. 17.

Pre karotenogénne kvasinky boli identifikované aj ďalšie karotenoidy - torulén (459, 482, 514 nm) a torularhodin (459, 482, 524 nm). Absorpčné maximum  $\beta$ -karoténu je charakteristický trojpík o vlnovej dĺžke 425, 450 a 477 nm. Dôvodom nízkej koncentrácie  $\beta$ -karoténu je pravdepodobne využitie  $\gamma$ -karoténu na produkciu torulénu a jeho oxidovanej formy thorularodinu, prípadne astaxanthínu u *P. rhodozyma* [64].



Graf č. 11 Stanovenie metabolitov vybraných druhov karotenogénnych kvasiniek na glukózovom médiu

Tab. 17. Množstvo metabolitov karotenogénnych kvasiniek na glukózovom médiu po 72. hodinách kultivácie

| Kmeň                                     |    | Celkové karotenoidy (µg/g) | β karotén (µg/g) | Ergosterol (mg/g) | TAG (mg/g) |
|--|----|----------------------------|------------------|-------------------|------------|
| <i>Rhodotorula aurantiaca</i>            | 1  | 1192,79                    | 189,2            | 2,79              | 24,64      |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>          | 4  | 516,58                     | 70,7             | 1,41              | 19,86      |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>          | 5  | 1154,35                    | 62,15            | 2,76              | 16,57      |
| <i>Phaffia rhodozyma</i>                 | 6  | 2190,62                    | 268,01           | 2,73              | 22,66      |
| <i>Cystofilobasidium capitatum</i>       | 7  | 1366,95                    | 116,34           | 2,58              | 28,66      |
| <i>Cystofilobasidium capitatum</i>       | 8  | 779,43                     | 55,32            | 2,2               | 13,3       |
| <i>Cystofilobasidium macerans</i>        | 9  | 415,55                     | 21,24            | 1,27              | 9,01       |
| <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> | 21 | 405,29                     | 7,25             | 1,25              | 13,5       |

### 5.3 Mutagenéza

V súčasnosti je vysoký obsah odpadných substrátov a navyše sa vyskumníci snažia znížiť náklady na biotechnologickú produkciu, pričom odpadné substráty im k tomu slúžia ako lacný zdroj uhlíka a dusíka. Ku každej sérii kultivačných experimentov bola vždy zaradená kontrolná kultivácia na glukózovom médiu, aby sa mohli sledovať zmeny rastu kultúry a produkcie metabolitov a teda využiteľnosť daného použitého odpadového materiálu.

#### 5.3.1 Využitie prietokovej cytometrie k analýze mutantných kmeňov

Boli použité mutantné kmeňe kvasiniek kultivované 72 hodín na glukózovom médiu a na médiách s odpadnými substrátmi podľa postupu uvedeného kapitole 4.5. Na meranie bolo použitých 100 µl vzorky pri prietoku 4,17 µl/ml. Meranie prebiehalo po dobu 30 sekúnd.

Bunky boli vhodne nariadené a premerané ako bez prídavku fluorescenčnej sondy, tak so sondou, ktorou bola nílka červen o koncentrácii 1 mg/ml (vid'. kap. 4.6)

Z histogramu boli spísané nasledujúce údaje: AFL - FL 590 predstavuje vlnovú dĺžku pre stanovenie karotenoidov. Karotenoidy fluoreskujú v zelenej a v žltej oblasti spektra (t.j. 500-600 nm). Fluorescencia sa v zelenej oblasti vo veľkej miere kryje s fluorescenciou koenzýmov, preto sa volí detektor meriaci pri 590 nm. V bunkách sa karotenoidy nenachádzajú voľne v roztoku, ale sú zakotvené v lipidických štruktúrach a membránach. Pri hromadení v membránach je vzťah medzi množstvom karotenoidov a fluorescenciou lineárny. Množstvo karotenoidov vypočítame vynásobením AFL - FL 590 s počtom buniek získaných za analýzu a použitým riedením.

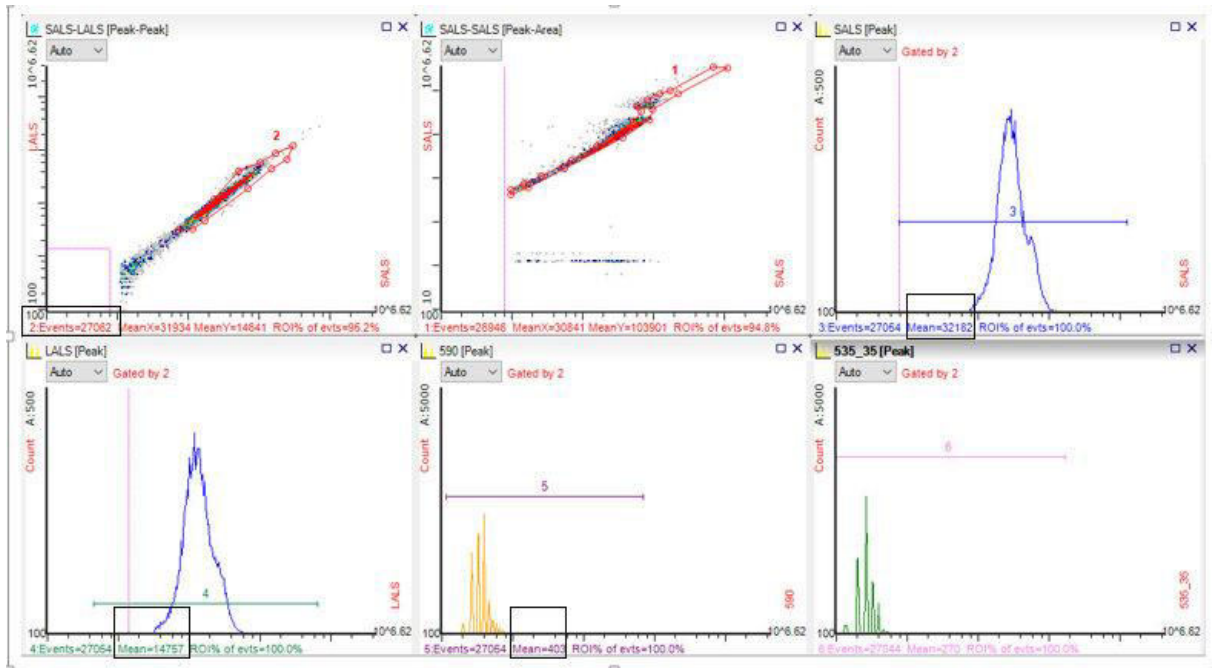
Samotná hodnota AFL590 môže slúžiť ako množstvo karotenoidov v jednej bunke, teda ekvivalent vyjadrení karotenoidov v mg/g biomasy.

Tento vzťah neplatí, ak sú karotenoidy zakotvené v lipid bodies. Laserový lúč prechádza do jadra granúl, čo neplatí o fluorescencii. Je to dané „roztokovým“ charakterom prostredia lipid bodies, v ktorom excitovaný stav karotenoidov nieje stabilizovaný a vyznačuje sa tak veľmi krátkou dobou života, čo zapríčiňuje nízke kvantové výťažky. Vzhľadom k vysokým koncentráciám karotenoidov dochádza opakovane k reabsorbci a disipácií svetelnej energie a je zaznamenaná len tá fluorescencia, ktorá pochádza z membrán.

NR 590 je odozva detektoru po pridaní nílkej červene, ktorá sa zainkorporovala do lipidov buniek. Pre lipidy platí podobný stav ako pre karotenoidy. Doba života a kvantové výťažky sú síce vyššie, ale vďaka reabsorbci nemôže byť presný záznam fluorescencie. Ďalším možným problémom je hladovanie buniek a konzumácia zásobných lipidov, čím sa významne mení vnútorná morfológia buniek a teda signál fluorescencie je skreslený. Množstvo lipidov môžeme vypočítať odčítaním NR 590 od AFL - FL 590 a následným vynásobením počtom buniek za analýzu a príslušným riedením.

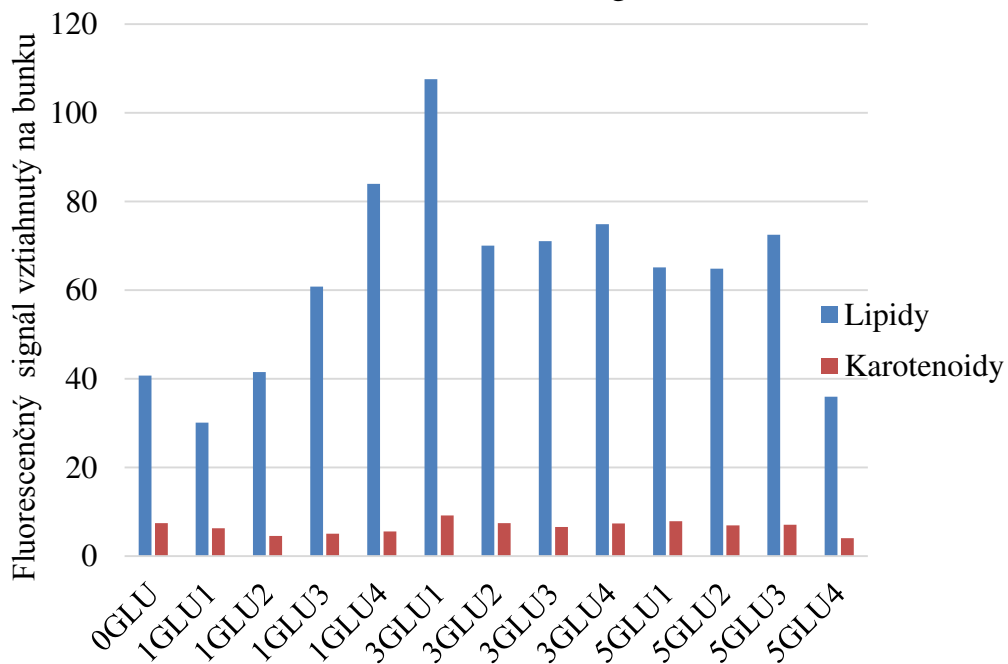
Z LALS a SALS, čo sú údaje o veľkosti a granularite buniek je vypočítané množstvo biomasy.

Cytometria slúži najmä ako orientačná metóda. Nemá jednotky a kalibrácia pomocou paralelného chromatografického alebo enzýmového stanovenia je obtiažna z vyššie uvedených dôvodov. Zo zrovnávacej analýzy ale vieme vybrať najproduktívnejšieho jedinca vrámci druhu. Pre presnejšie stanovenie lipidov je lepšie použiť plynovú chromatografiu [65].



Obr.18. Záznam (histogram) z prietokového cytometra pre kvasinku *Cystofilobasidium capitatum* v čase 0 na glukózovom médiu. V čiernych obdĺžnikoch sú použité hodnoty pre výpočty.

### Produkcia metabolitov na glukózovom médiu



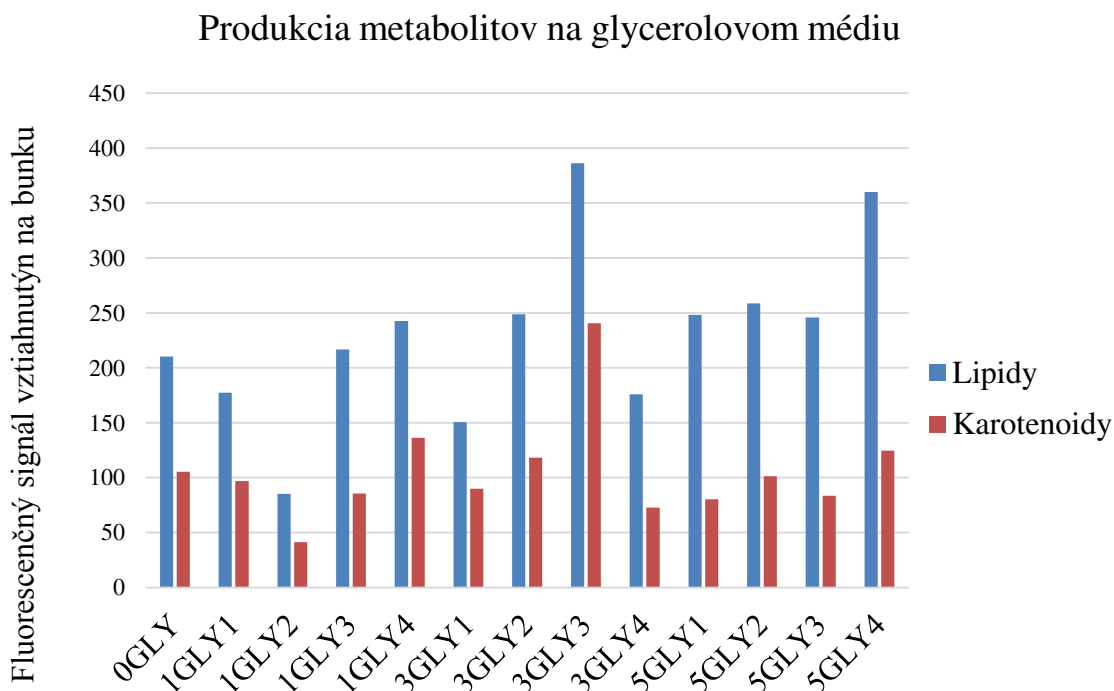
Graf č. 12 Produkcia metabolitov *Cystofilobasidium capitatum* na glukózovom médiu

Číslo pred skratkou (1,3 a 5) znamená minútu ožiarenia, GLU je skratka pre glukózové médium a číslo za skratkou udáva vyselektovanú kolóniu (1,2,3,4).

V porovnaní s kontrolnou miskou v čase 0, ktorá nebola podrobená UV mutácií je zrejmé, že mutácie majú vplyv na množstvo lipidov a ožiarení bol sledovaný nárast tohto metabolitu. Množstvo karotenoidov sa sa zmenilo minimálne. Nižší výtťažok karotenoidov v porovnaní s kontrolnou miskou vykazuje najmä miska po 1. minúte ožiarenia a po 5. minúte ožiarenia

pre 4. kolónu. Výtťažok lipidov je v porovnaní s kontrolou nižší v dvoch prípadoch a to 1. minúte na 1. kolónii a v 5. minúte na 4. kolónii.

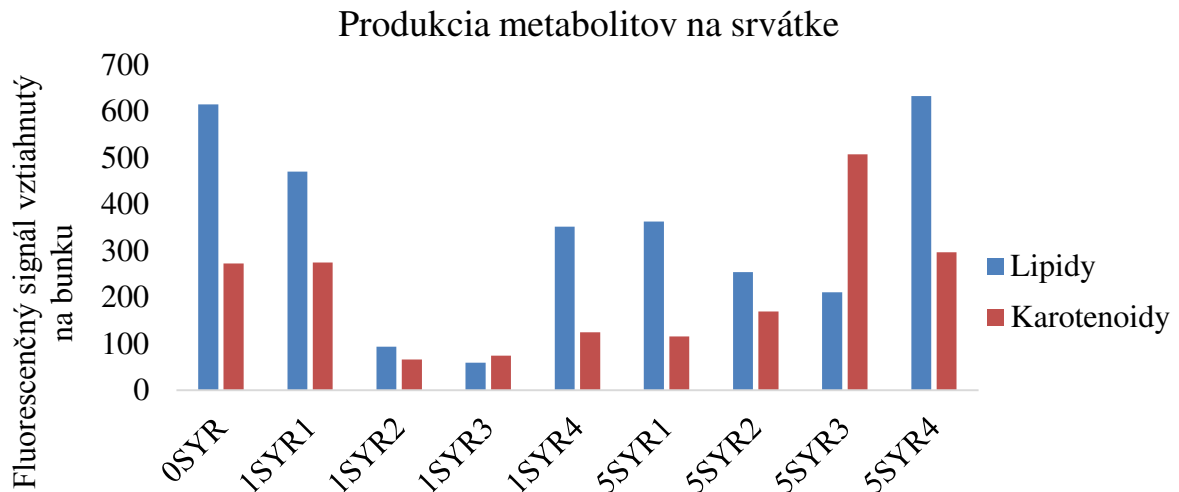
Z grafu pre produkciu metabolitov na glukózovom médiu vyplýva, že najvyšší fluorescenčný signál pre oba metabolity je zaznamenaný pre karotenogénnu kvasinky *Cystofibosidium capitatum* v tretej minúte ožiarenia pre kolóniu č. 1 z danej misky. Vyššia produkcia lipidov je zaznamenaná pre 1. misku a 4. kolóniu, pričom obsah karotenoidov je veľmi nízky.



Graf č. 13 Produkcia metabolitov *Cystofibosidium capitatum* na glycerolovom médiu

Číslo pred skratkou (1,3 a 5) znamená minútu ožiarenia, GLY je skratka pre glycerolové médium a číslo za skratkou udáva vyselektovanú kolóniu (1,2,3,4).

V porovnaní s kontrolnou miskou v čase 0, ktorá nebola podrobená UV mutácii je zrejme, že aj v tomto prípade mutácie majú vplyv na množstvo lipidov a karotenoidov, ale nie v takej miere, v akej bol sledovaný na glukózovom médiu. U väčšiny je pozorovaný pokles obsahu karotenoidov v porovnaní s kontrolou. Vysoký nárast tohto metabolitu je v 3. minúte ožiarenia v 3. kolónii. Táto kolónia zároveň vykazuje najvyššiu hodnotu lipidov. Vysokú hodnotu lipidov a karotenoidov vykazuje aj 4. kolónia v 5. minúte ožiarenia. Celková najnižšia produkcia je po 1. minúte ožiarenia na 2. kolónii.



Graf č. 14 Produkcia metabolitov *Cystofilobasidium capitatum* na srvátke

Z grafu je zrejmé, že oba metabolity po mutácii sú nižšie v porovnaní s kontrolnou miskou. Jedinou výnimkou pre oba metabolity je 4. kolónia po 5. minútach ožiarenia. Vysoký obsah karotenoidov oproti kontrole má aj 3. kolónia v tej istej minúte. Kolónie po 3. minúte ožiarenia nenarástli.



Obr.19. Mutované kvasinky v glukózovom (G) a glycerolovom (GLY) médiu po 72. hodinách kultivácie



Pre porovnanie, na Obr.19 môžeme vidieť rozdiel vo farbe kvasiniek ako medzi médiami bez pôsobenia mutantného činiteľa, tak medzi rozdielnou dobou pôsobenia mutagénu. Napr. kolónia č.2 je v 1. minúte pôsobenia UV žiarenia zo všetkých najbledšia, ale v čase 3. najtmavšia.

Môžeme tvrdiť, že doba pôsobenia mutantu má vplyv na tvorbu pigmentov a pre každú kolóniu je lepší rôzny čas pôsobenia mutagénu. Z obrázku ďalej vyplýva, že glukózové médium je lepšie pre rast a rozmnožovanie kvasiniek. Niektoré kvasinky po mutácií na glycerolovom médiu sú v porovnaní s kontrolou (čas 0 min) ešte bledšie a môžeme tvrdiť že obsah metabolitov bol nižší ako v kontrolnom médiu, čo vidíme aj v Graf č. 13.

### 5.3.2 Kultivácia mutantných kmeňov

Z prietokovej cytometrie bolo vybratých niekoľko mutantných kmeňov z každého substrátu, ktoré vykazovali najlepšie produkčné vlastnosti daných metabolitov. Vybraté mutantné kmene boli kultivované cez dvojkrokové inokulum a po 72 hodinách kultivácie v produkčnom médiu bolo stanovené množstvo biomasy, karotenoidou metódou HPLC s PDA detektorom a množstvo lipidov enzymaticky.

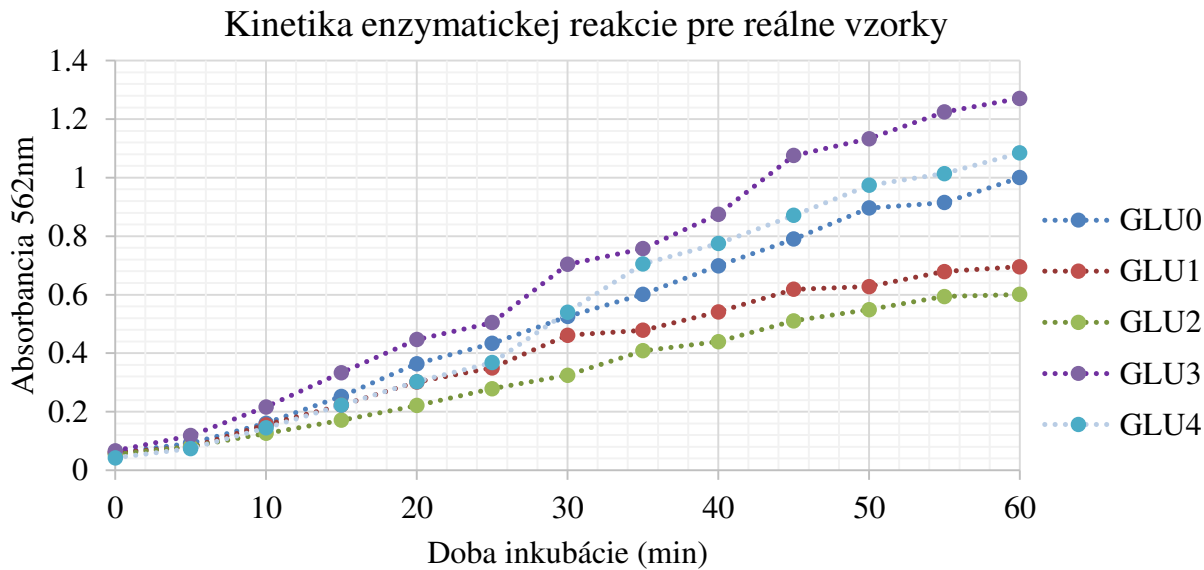
Pre ďalšiu kultiváciu boli vybraté z glukózového a glycerolového média všetky kolónie z 3. minúty ožiarenia. Zo srvátky bola použitá 3. a 4. kolónia 5. minúty ožiarenia.

#### 5.3.2.1 Stanovenie metabolitov

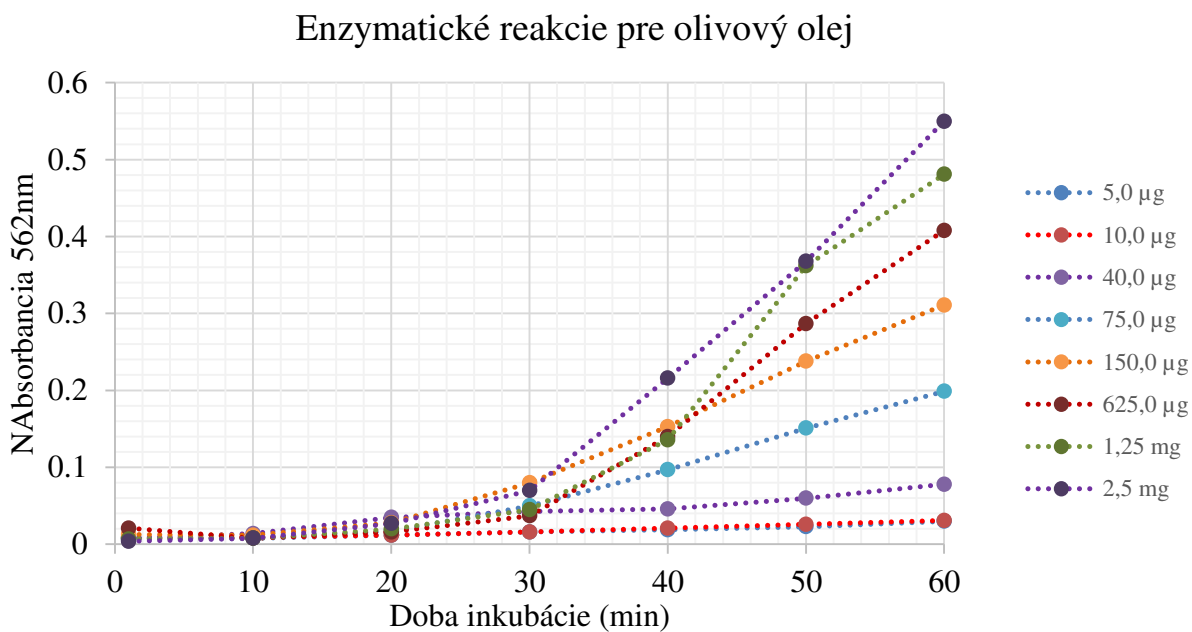
Pre enzymatické stanovenie lipidov bol použitý komerčný enzymatický kit pre stanovenie sérových TAG. V priloženom protokole od výrobcu k použitiu daného kitu je doporučené inkubovať vzorky s reakčnou zmesou pri najmenej 37°C po dobu 5 minút, čo ale nebolo dostačujúce, pretože nedochádzalo k dostatočnej kolorimetrickej reakcii u reálnych vzoriek. Z tohto dôvodu bolo prevedené kinetické meranie na ELISA readru po dobu 60 minút a zároveň bol porovnaný glycerolový štandard s obsahom voľných TAG s olivovým olejom, ako simulácia reálnych vzoriek. Ku kvantifikácii bola vytvorená kalibračná krivka TAG štandardu po 50. minútach inkubácie (podľa kap. 4.4.8.3)

Pre porovnanie bola vytvorený graf z vhodne nariadeného olivového oleja po hodinovej inkubácii Graf č. 16 a rovnako graf z vhodne nariadeného glycerolového štandardu po hodinovej inkubácii Graf č. 17

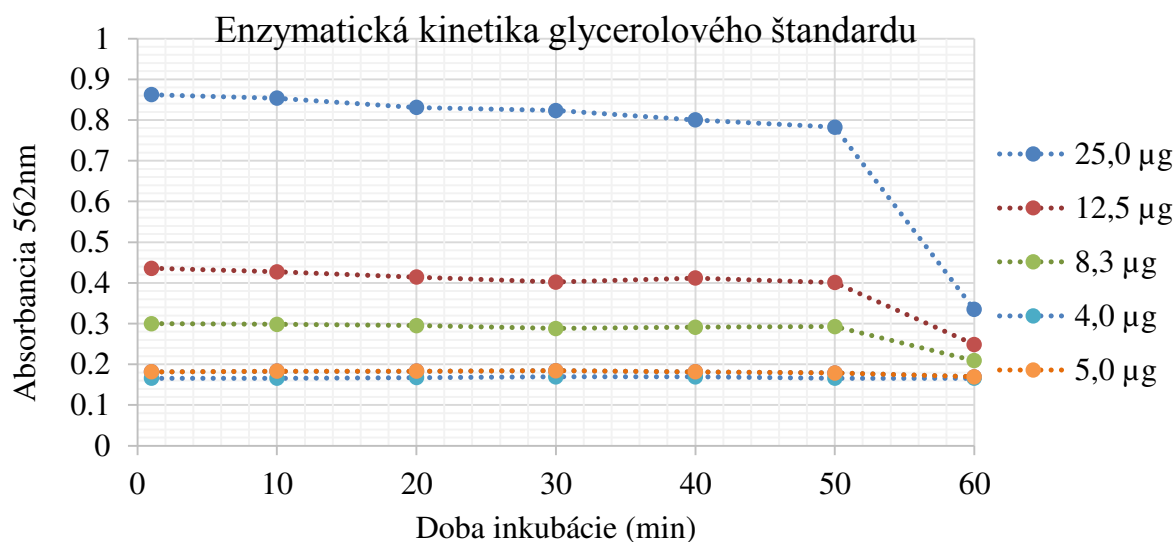
Pri reakcii oleja s reagentom musí najskôr dôjsť k rozštiepeniu triacylglycerolu na voľný glycerol a mastné kyseliny. Následne sa sleduje spektrofotometrický nárast voľných TAG. U oleja ani po hodine k stacionárnemu stavu nedošlo a reakcia stále pokračovala. V prípade glycerolového štandardu obsahujúceho voľný glycerol dochádza priamo k reakcii, a preto k výraznému poklesu dochádza po 50 min. inkubácie. U reálnych vzoriek nastáva podobný prípad ako u oleja (viď Graf č. 15). Ani po hodine nedošlo k dosiahnutiu stacionárneho stavu, ale po 50tej minúte už nie je stúpanie tak prudké, preto v prípade vyhodnotenia vzoriek bola vybratá 50. minúta doby inkubácie, ako kompromis medzi chovaním glycerolového štandardu a reálnych vzoriek.



Graf č. 15 Enzymatické reakcie reálnych vzoriek po hodinovej inkubácii

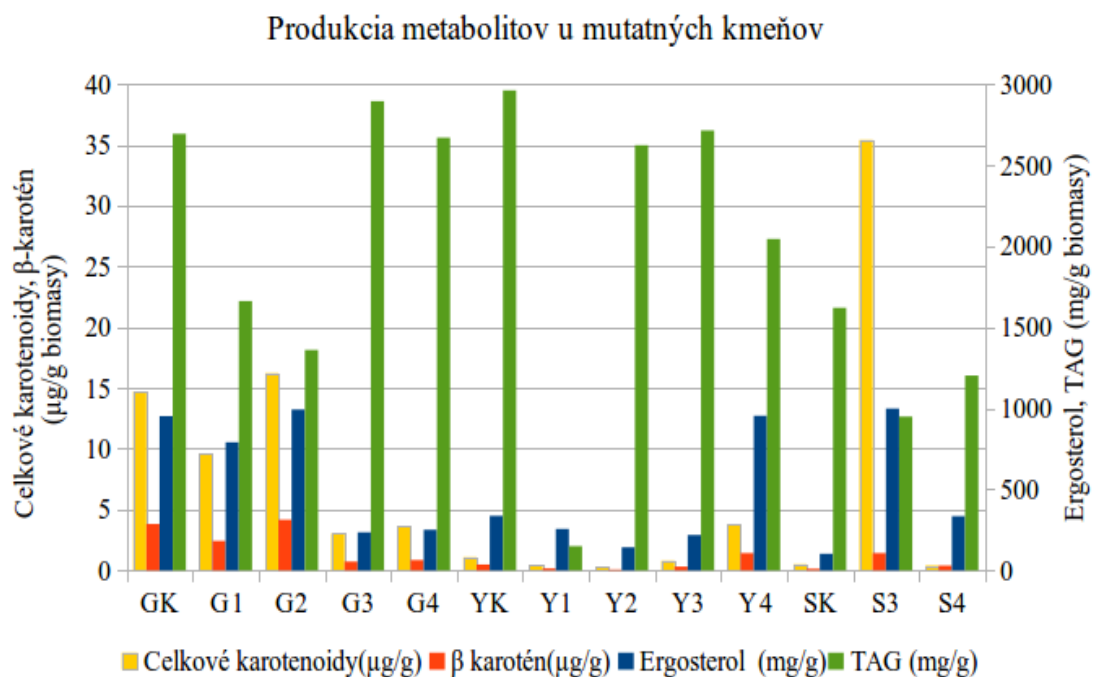


Graf č. 16 Enzymatické reakcie pre olivový olej po hodinovej inkubácii



Graf č. 17 Enzymatické reakcie glycerolového štandardu po hodinovej inkubácii

Z grafov vyplýva, že možno odvodiť približné množstvo TAG vo vzorkách aj keď nedošlo k úplnej premene substrátu. Hodnoty získané touto metódou sú orientačné a môžu poslúžiť najmä k porovnaniu produkcie TAG v rámci mutantných kmeňov.



Graf č. 18 Produkcia metabolitov mutantných kmeňoch na odpadných substrátoch a glukóze po mutácii (G-glukóзовé médium, Y-glycerolové médium, S-srvátkové médium)

Na Graf č. 18 sú znázornené rozdiely v produkcii metabolitov v jednotlivých médiách. Metabolity boli vzťahnuté na množstvo biomasy, ktoré je uvedené v Graf č. 19.

Ako vidieť, celkovo najvyššia produkcia lipidov je na glycerolovom médiu bez pôsobenia mutagénu a celkovo na médiách bez pôsobenia mutagénu. Vyššia produkcie lipidov je pozorovaná oproti kontrolnému médiu na glukózovom médiu na 3. kolónii. Lipidy u zvyšných producentov sú približne v rovnakom alebo nižšom množstve. Môžeme sa domnievať, že mutácia má skôr negatívny vplyv na tvorbu lipidov. Podobne je to aj s ďalšími metabolitmi.

Celkové karotenoidy sú na glycerolovom a srvátkovom médiu veľmi nízke, rovako ako  $\beta$ -karotén. Výnimku tvorí 3. kolónia na srvátkovom médiu, kde je celkový obsah karotenoidov najvyšší ako v porovnaní s kontrolou, tak so všetkými médiami. Na glukózovom médiu je najlepším producentom karotenoidov a ergosterolu 2. kolónia, ale jej obsah lipidov je zároveň najnižší.

Ergosterol vykazuje vyššie hodnoty v porovnaní s kontrolným médiom najmä na srvátke a na glycerolovom médiu pre 4. kolóniu, pričom na glukózovom je v porovnaní s kontrolným médiom takmer rovnaký.

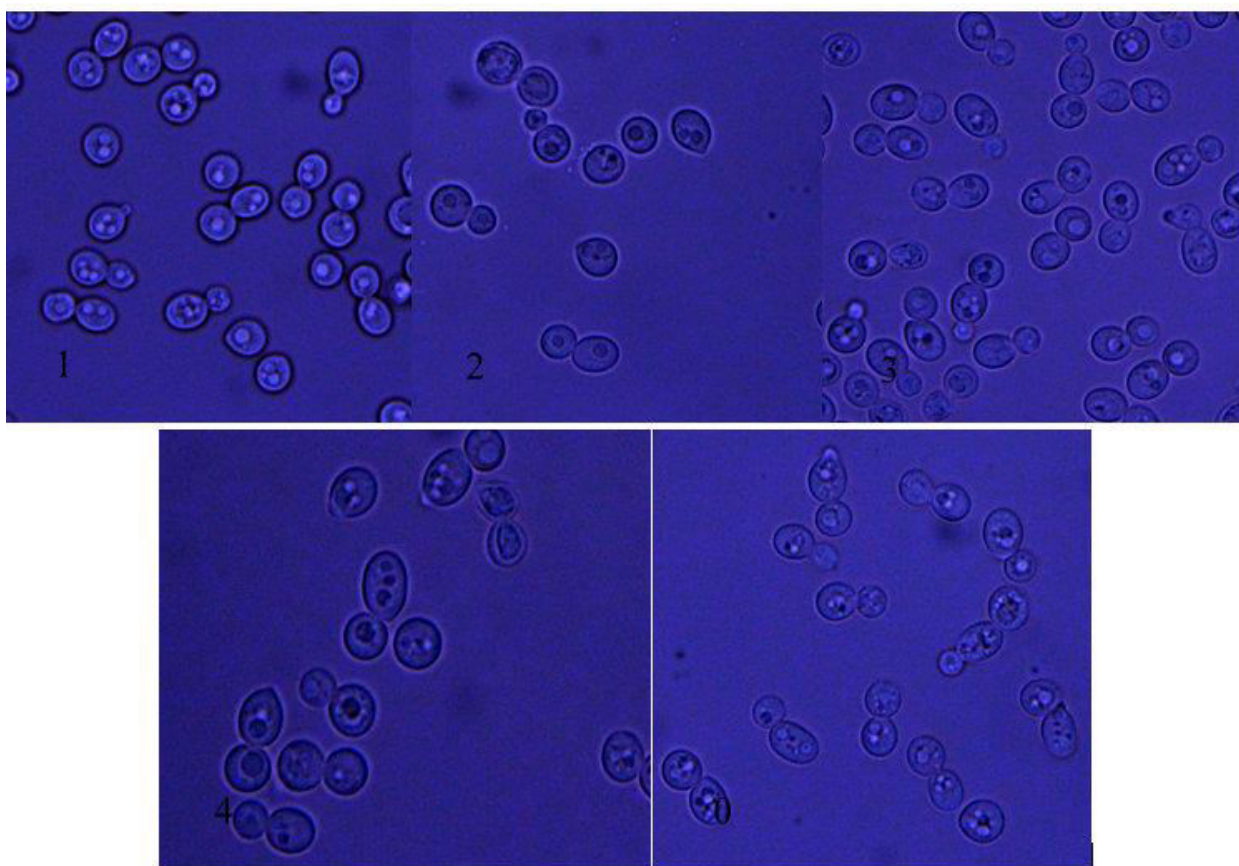
Môžeme povedať, že sa náhodným výberom nepodarilo vyselektovať mutanty, pre ktoré by bol odpadný substrát glycerol vhodným zdrojom výživy a energie a prítomnosť mutagénu skôr inhibuje produkciu nami sledovaných metabolitov. U tohto kmeňa bola ale nameraná síce najvyššia produkcia lipidov, ale iba na kontrolnom médiu bez použitia UV ako mutagénu.

Rovnako sa v konečnom výsledku javí aj odpadná srvátka, kde bol sledovaný celkovo najvyšší obsah celkových karotenoidov, ale iba v prípade 3. kolónie. Táto kolónia sa vyznačuje aj vyššou produkciou ergosterolu v porovnaní s kontrolou.

V tejto sérii kultivácie sa ako vhodnejší substrát na kultiváciu ukázala glukóza, ako základný a rýchly zdroj uhlíka. Odpadná srvátka a glycerol sú náročnejšie na utilizáciu. Vplyv mutagénu má vo väčšine prípadov skôr ihhibičný účinok.

Tab. 18. Množstvo metabolitov mutovanej kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* v rôznych druhoch média

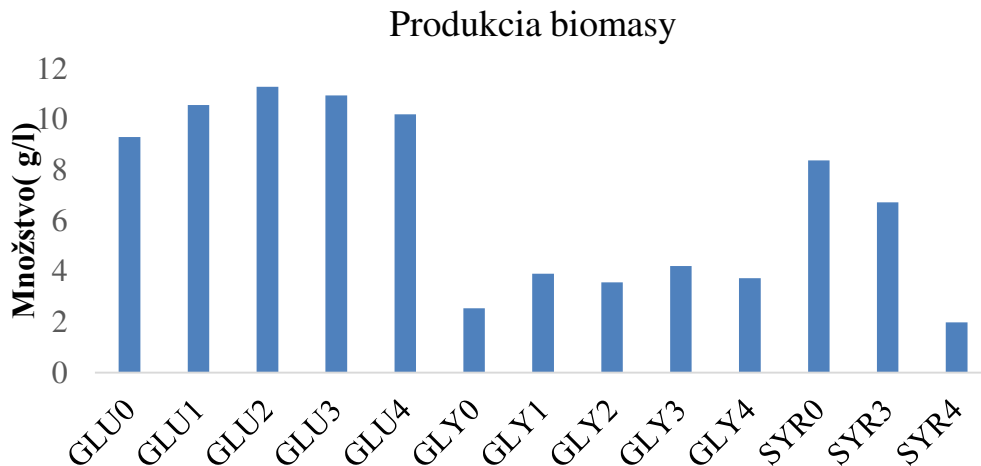
| Kmeň | Celkové karotenoidy( $\mu\text{g/g}$ ) | $\beta$ karotén( $\mu\text{g/g}$ ) | Ergosterol (mg/g) | TAG (mg/g) |
|------|--|------------------------------------|-------------------|------------|
| GLU0 | 1102,93                                | 285,99                             | 12,69             | 35,91      |
| GLU1 | 718,56                                 | 181,45                             | 10,53             | 22,15      |
| GLU2 | 1216,09                                | 312,52                             | 13,23             | 18,13      |
| GLU3 | 226,39                                 | 54,38                              | 3,12              | 38,60      |
| GLU4 | 273,62                                 | 63,61                              | 3,35              | 35,59      |
| GLY0 | 81,47                                  | 35,62                              | 4,48              | 39,48      |
| GLY1 | 30,22                                  | 12,28                              | 3,41              | 1,99       |
| GLY2 | 22,76                                  | 4,91                               | 1,90              | 34,97      |
| GLY3 | 59,03                                  | 22,74                              | 2,90              | 36,19      |
| GLY4 | 280,77                                 | 106,77                             | 12,72             | 27,26      |
| SYRK | 37,36                                  | 9,64                               | 1,36              | 21,61      |
| SYR3 | 2656,02                                | 106,50                             | 13,30             | 12,65      |
| SYR4 | 29,34                                  | 29,34                              | 4,46              | 16,02      |



Obr.20. Záznam z mikroskopu kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* po mutácii na glukózovom médiu

V porovnaní s kontrolnou nedošlo v prípade kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* (č.8) ku zmene tvaru a veľkosti buniek. Bunky sú guľovitého až pretiahnutého tvaru. Na Obr.20 sú znázornené kolónie po 3. minúte pôsobenia UV žiarenia na glukózovom médiu. Môžeme vidieť biele miesta, rovnako ako u kvasiniek, ktoré neboli podrobené mutácii. Ide zrejme o akumulované lipidy („lipid bodies“). U niektorých kolónií sú tieto miesta výraznejšie a vidieť ich vo väčšom počte. Môžeme sa domnievať, že mutácia mala vplyv na množstvo akumulovaných lipidov, čo môžeme vidieť aj na Graf č. 18. Napr. na kolónii č. 2 tieto biele miesta nevidieť a v porovnaní s vyššie uvedeným obrázkom skutočne množstvo lipidov je výrazne nižšie ako na kontrolnom médiu. Mikroskopické snímky odpovedajú aj analýze množstva metabolitov (Tab. 18)

Najvyšší množstvo biomasy vykazuje *Cystofilobasidium capitatum* po 72. hodine kultivácie na glukózovom médiu, najmä po mutácii. Vyššie množstvo je zaznamenané aj pre kontrolnú misku na srvátkovom médiu. Najnižšie výtťažky sú pre glycerolové médium, pričom najmenej biomasy bolo na kontrolnom médiu.



Graf č. 19 Produkcia biomasy na rôznych substrátoch

### 5.3.3 Stabilita genómu mutantných kmeňov sledovaná pomocou DGGE

Ribozomálne gény sa nachádzajú vo viacerých kópiách v genóme vo forme repetitívnych úsekov a z tohto dôvodu boli tieto sekvenice amplifikované u mutantných kmeňov a boli porovnávané s pôvodným kmeňom. Úsek 5,8S-ITS2 rDNA je najdlhší a najvariabilnejší úsek, preto bol vybraný pre porovnaní medzi mutantnými kmeňmi s pôvodným kmeňom.



Obr.21. Oblasť 5,8S-ITS2 rDNA mutovanej karotenogénnej kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*

Na Obr.21 sú znázornené zóny DNA kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* po mutácii UV žiarením z 3. minúty na glycerolovom médiu (Y) a na glukózovom médiu (G). Číslo znázorňuje vyselektovanú kolóniu (metóda vid'. kapitola 4.3.6) Ako vidieť, mutácia nemala vplyv na integritu genómu oblasti 5,8S-ITS2 rDNA. Vzhľadom k tomu, že nevzniklo viac zón a ich umiestnenie je rovnaké ako pri kontrole je pravdepodobné, že nedošlo k mutácii v týchto sekvenciách.

## 6 ZÁVER

Cieľom práce bolo nájsť zo skupiny zbierkových kmeňov taký karotenogénny kmeň kvasinky, ktorý sa vyznačuje nadprodukciou metabolitov, a to najmä karotenoidov a lipidov. V ďalšej fáze boli vybrané kmene podrobené náhodnej mutagenéze spôsobenej UV žiarením a bol vyhodnotený vplyv tohto mutantného činiteľa ako na produkciu metabolitov, tak na genóm kvasiniek pri kultivácii na glukóze I na odpadných substrátoch.

V prvej časti práce boli charakterizované rastové a produkčné vlastnosti vybraných karotenogénnych kvasiniek. Pre ľahšie spracovanie boli kvasinky označené číslom. Bolo použitých celkovo 8 kmeňov a to

*Rhodotorula aurantiaca* CCY 20-9-7 (1), *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 20-7-28 (4), *Rhodotorula mucilaginosa* 20-7-31 (5), *Phaffia rhodozyma* CCY 77-1 (6),

*Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1 (7), *Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-2 (8), *Cystofilobasidium macerans* CCY 17-9-3 (9),

*Cystofilobasidium infirmominiatum* CCY 17-18-4 (21).

Sledovala sa produkcia,  $\beta$ -karoténu, ergosterolu a bolo stanovené aj celkové množstvo karotenoidov. Následne bol vybraný kmeň kvasiniek, ktorý preukázal dobré produkčné vlastnosti. Najvyšší obsah triacylglycerolov je u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* (7) a to 28,66 mg/g biomasy. Vyššie hodnoty sú zaznamenané aj pre kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* (1) 24,64 mg/g a pre kmeň *Phaffia rhodozyma* (6) 22,66 mg/g. Tieto kvasinky sa vyznačujú taktiež aj vyšším obsahom celkových karotenoidov, kde *Phaffia rhodozyma* (6) obsahuje 2190,62  $\mu$ g/g *Cystofilobasidium capitatum* (7) 1366,95  $\mu$ g/g. Koncentrácia  $\beta$ -karoténu je veľmi nízka. Najvyššiu hodnotu vykazujú opäť *Phaffia rhodozyma* (6) a to 268,01  $\mu$ g/g a kmeň *Rhodotorula aurantiaca* (1) 189,20  $\mu$ g/g.

*Cystofilobasidium capitatum* (8) bolo podrobené mutagenéze pomocou UV žiarenia po dobu 1, 3 a 5 minút. Tento kmeň bol vybraný kvôli naviazanosti na predchádzajúce štúdie, kde sa preukázal ako najlepší producent TAG a zároveň ako relatívne dobrý producent pigmentu na odpadnom glycerole ako zdroji uhlíka [63]. Na kultiváciu boli použité dva odpadné substráty- glycerol a srvátka a ako kontrolné medium pre porovnanie slúžila glukóza. Náhodne boli vyselektované a vybrané 4 kolónie s najintenzívnejším zafarbením. Pomocou prietokovej cytometrie bolo stanovené pomerné množstvo karotenoidov a lipidov.

Z hodnôt získaných pomocou prietokového cytometra bol vybraný najlepší čas pôsobenia muutagénu, ktorým bola 3. minúta. Následne bola vykonaná druhá kultivácia cez dvojkrokové inokulum pre všetky tri substráty z tejto minúty a po 72. hodinách v produkčnom médiu bol stanovený obsah lipidov enzymaticky a karotenoidy pomocou HPLC s PDA detektorom.

Na glukózovom médiu sa ako najlepší producent ergosterolu (13,23 mg/g), celkových karotenoidov (1216,10  $\mu$ g /g) a  $\beta$ -karoténu (312,52  $\mu$ g/g) v porovnaní s kontrolou javila 2. kolónia, ktorá mala ale zároveň najnižšiu produkciu lipidov. Zaujímavé je, že kolónia č. 3, ktorá sa javí ako najlepší producent TAG, má zároveň najnižšie výt'azky zvyšných metabolitov.

Na glycerolovom médiu sa jednoznačne ako najlepší producent ergosterolu (12,72 mg/g), celkových karotenoidov (280,77  $\mu$ g /g) a  $\beta$ -karoténu (106,77  $\mu$ g/g) javila kolónia č. 4. Aj tu môžeme vidieť ale zároveň najnižšiu produkciu lipidov.

Pre srvátkové medium platí to, čo v predchádzajúcom prípade, kolónia č.3 má najvyššie hodnoty ergosterolu (13,30 mg/g), celkových karotenoidov (2656,02  $\mu$ g/g) a  $\beta$ -karoténu (106,50  $\mu$ g/g), ale zaznamená najvyššiu produkciu lipidov.

V srvátkovom a glycerolovom médiu má najvyššie množstvo lipidov kontrolná miska, ktorá nebola podrobená mutácii.

V tejto sérii kultivácie sa ako vhodnejší substrát na kultiváciu ukázala glukóza ako základný a rýchly zdroj uhlíka. Odpadná srvátka a glycerol sú náročnejšie na utilizáciu a navyše sa kmene museli brániť účinkom mutagénu. Vplyv mutagénu má väčšine prípadov skôr ihhibičný účinok. Sledované metabolity boli vo väčšej miere nižšie v porovnaní s kontrolnou miskou, ktorá nebola podrobená mutácii. Karotenoidy i steroly mohli byť vyčerpané práve na obranu proti UV stresu. Predložená diplomová práca sa ďalej zaoberala molekulárnou charakterizáciou karotenogénnych kvasiniek. Použitými technikami pre analýzu konzervovaných úsekov rDNA D1/D2 oblasti veľkej ribozomálnej podjednotky 26S oblasti a ITS1 a 5,8-ITS2 oblastí boli „nested“ PCR a denaturačná gradientová elektroforéza DGGE.

Z výsledkov DGGE vyplýva, že všetky analyzované kmene karotenogénnych kvasiniek majú veľmi podobnú sekvenciu týchto oblastí, kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* (4) so zbierkovým číslom CCY 20-7-28 sa jediná odlišovala v sekvencii zmiených oblastí.

Záverom zo sekvenovania ukazujú odlišnosť u šiestich druhov analyzovaných karotenogénnych kvasiniek. Z výsledkov vyplýva, že všetky použité druhy kvasiniek sa môžu radiť k druhu *Rhodotorula mucilaginosa*. Kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa*, ktorá sa odlišovala v sekvencii vyššie zmiených oblastí, bola jednoznačne potvrdená ako *Rhodotorula mucilaginosa*. Dôvodom môže byť nižšia spoľahlivosť sekvenovania spôsobená nízkou koncentráciou DNA vo vzorkách. Tiež sa môže jednať o odlišnosť v rámci rovnakého druhu pre iný kmeň. Tieto výsledky mohli byť spôsobené aj nedávnou taxonomickou reklasifikáciou, ktorá začala byť založená na sekvenciách ribozomálnych génov. Ďalším aspektom môže byť okrem uvedenej nízkej kvality výsledkov sekvenovania tiež veľké zastúpenie druhu *Rhodotorula mucilaginosa* v databézi NCBI (najrozšírenejší druh karotenogénnych kvasiniek).

Pomocou DGGE bolo zistené, že mutácia nemala vplyv na integritu genómu oblasti 5,8S-ITS2 rDNA. Vzhľadom k tomu, že nevzniklo viac zón a ich umiestnenie je rovnaké ako pri kontrole je pravdepodobné, že nedošlo k mutácii v týchto sekvenciách.

Záverom je možné konštatovať, že karotenogénne kmene sa môžu výrazne líšiť v produkcii lipidických metabolitov. Niektoré kmene majú perspektívu využitia ako priemyselné produkčné kmene najmä špecifických metabolitov. Náhodná mutagenéza a selekcia mutantných kmeňov je možnou stratégiou pre prípravu nadprodukčných kmeňov. Súčasne je alternatívnou cestou ku konštrukcii cielene geneticky modifikovaných kmeňov, ktoré nie sú všeobecne prijímané v potravinárskych a farmaceutických aplikáciách. Selekcii mutantov je však veľmi pracná a musela by byť prevedená podstatne rozsiahlejším spôsobom, než umožnila predložená práca. Bolo však preukázané, že je možné previesť mutagenézu bez zásadného ovplyvnenia dôležitých oblastí genómu.



## 8 BIBLIOGRAFIE

- [1] KURTZMAN, Cletus. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011. ISBN 978-012-3847-089.
- [2] WANG, Q.-M., A.M. YURKOV, M. GÖKER et al. *Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina*. b.r. DOI: 10.1016/j.simyco.2015.12.002. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166061615000287>
- [3] *TREE OF LIFE web project: Basidiomycota* [online]. USA: TREE OF LIFE project, 2012 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://tolweb.org/Basidiomycota/20520>
- [4] ZHU, Zhiwei, Sufang ZHANG, Hongwei LIU et al. *A multi-omic map of the lipid-producing yeast Rhodosporidium toruloides*. b.r. DOI: 10.1038/ncomms2112. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms2112>
- [5] KOH, Chong Mei, Yanbin LIU MOEHNINSI, Minge DU a Lianghai JI. *Molecular characterization of KU70 and KU80 homologues and exploitation of a KU70-deficient mutant for improving gene deletion frequency in Rhodosporidium toruloides*. b.r. DOI: 10.1186/1471-2180-14-50. Dostupné také z: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-14-50>
- [6] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [7] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990, 699 s., [72] s. obr. příl. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.
- [8] KURTZMAN, C a Jack W FELL. *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, 2000, xviii, 1055 p. ISBN 04-448-1312-8.
- [9] YURKOV, A. M., M. M. VUSTIN, B. V. TYAGLOV, I. A. MAKSIMOVA a S. P. SINEOKIY. *Pigmented basidiomycetous yeasts are a promising source of carotenoids and ubiquinone Q10*. b.r. DOI: 10.1134/S0026261708010013. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1134/S0026261708010013>
- [10] ČAČKOVÁ, Katarína. *Náhodná mutageneze a selekce kmenů karotenogenních kvasinek schopných využít vybrané odpadní substráty* [online]. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2012 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/5968>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [11] MONTANTI, Justin, Nhuan P. NGHIEM a David B. JOHNSTON. *Production of Astaxanthin from Cellulosic Biomass Sugars by Mutants of the Yeast Phaffia rhodozyma*. b.r. DOI: 10.1007/s12010-011-9165-7. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-011-9165-7>
- [12] HÁRONIKOVÁ, Andrea. *Mikrobiální produkce karotenoidních pigmentů s využitím odpadních substrátů*. Brno, 2010. Vysoké učení technické v Brně.
- [13] SANDMANN, Gerhard. *Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants*. b.r. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18961.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18961.x>
- [14] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-

866-5903-8.

- [15] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1.
- [16] CERTIK, M a S SHIMIZU. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, **87**(1), 1-14. DOI: 16232418.
- [17] CHEIRSILP, Benjamas a Yasmi LOUHASAKUL. *Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel*. b.r. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413007724>
- [18] VOET, D. a J.G. VOETOVÁ. *Biochemie*. 1 české vyd. Praha: Victoria publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9.
- [19] LEHNINGER, Albert L., David L. NELSON a Michael M. CPX. *Lehninger principles of biochemistry*. 6 th ed. New York: W.H. Freeman, b.r. ISBN 978-1- 4292-3414-6.
- [20] PAPANIKOLAOU, Seraphim. *Oleaginous Yeasts: Biochemical Events Related with Lipid Synthesis and Potential Biotechnological Applications*. b.r. DOI: 10.4172/2167-7972.1000e103. Dostupné také z: <http://www.omicsgroup.org/journals/2167-7972/2167-7972-1-e103.digital/2167-7972-1-e103.html>
- [21] MARTÍNEZ, Elia, Vijaya RAGHAVAN, Fernando GONZÁLEZ-ANDRÉS a Xiomar GÓMEZ. *New Biofuel Alternatives: Integrating Waste Management and Single Cell Oil Production*. b.r. DOI: 10.3390/ijms16059385. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/5/9385/>
- [22] ABGHARI, Ali a Shulin CHEN. *Yarrowia lipolytica as an Oleaginous Cell Factory Platform for Production of Fatty Acid-Based Biofuel and Bioproducts: the origin, evolution, and impact of doi moi*. b.r. DOI: 10.3389/fenrg.2014.00021. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fenrg.2014.00021/abstract>
- [23] MURRAY, Robert K. *Harperova biochemie*. 23. vyd. Jinočany: H H, 2002, ix, [3], 872 s. ISBN 80-731-9013-3.
- [24] PARK, Cheon Seok, Young-Sun SOHN, Caroline CRISPINO, Ching Chuan CHANG a Dewey D.Y. RYU. *Isolation of oversecrting mutant strains of the yeast Yarrowia lypolytica*. b.r. DOI: 10.1016/S0922-338X(97)86764-5. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0922338X97867645>
- [25] XIAO, Wei. *Yeast protocols*. 2 ed. totowa, NJ: Humana Pr., 2006. ISBN 1-58829-437-4.
- [26] TURŇA, Ján. *Rekombinantné DNA a biotechnologie*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-050-0079-0.
- [27] COOPER, Geoffrey M. *The cell: a molecular approach*. 2nd ed. Washington (DC): ASM Press, 2000. ISBN 08-789-3106-6.
- [28] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN ISBN 80-856-0571-6.
- [29] STANISLAV, ROSYPAL. *Úvod do molekulární biologie*. Čtvrté inovované vydání. Brno, 290 s. Díl I. Molekulární biologie prokaryotické buňky. Brno: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc., 2006. ISBN 80-902562-5-2.
- [30] LUNDIN, C. *Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no*

- detectable in vivo DNA double-strand breaks*. b.r. DOI: 10.1093/nar/gki681. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gki681>
- [31] HOLÁ, M., R. VÁGNEROVÁ a K.J. ANGELIS. *Mutagenesis during plant responses to UVB radiation*. b.r. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.12.013. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942814003830>
- [32] STAREČKOVÁ, Terezie. *Využití odpadních surovin k produkci obohacené kvasinkové biomasy* [online]. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2011 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/9163>. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [33] EASTERLING, Emily R., W. Todd FRENCH, Rafael HERNANDEZ a Margarita LICHA. *The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of Rhodotorula glutinis*. b.r. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.030. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004768>
- [34] PAGLIARO, Mario a Michele ROSSI. *Future of Glycerol*. 2nd ed. Cambridge: RSC Publishing, 2010. ISBN 978-1-84973-046-4.
- [35] *New Uses for Crude Glycerin from Biodiesel Production* [online]. 2012 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://articles.extension.org/pages/29264/new-uses-for-crude-glycerin-from-biodiesel-production>
- [36] KADLEC, Pavol. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 80-7080-510-2.
- [37] DRDÁK, Milan. *Základy potravinářských technologií*. Bratislava: Malé Centrum, 1996. ISBN 80-967064-1-1.
- [38] SUKOVÁ, Irena. *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. ISBN 80-7271-173-3.
- [39] TAHA, Ameer Y., Adam H. METHEREL a Ken D. STARK. *Comparative analysis of standardised and common modifications of methods for lipid extraction for the determination of fatty acids*. b.r. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.087. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612002750>
- [40] CARRASCO-PANCORBO, Alegría, Natalia NAVAS-IGLESIAS a Luis CUADROS-RODRÍGUEZ. *From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis*. b.r. DOI: 10.1016/j.trac.2008.12.005. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608002811>
- [41] XIAO, Liping, Svein Are MJØS a Bjørn Ole HAUGSGJERD. *Efficiencies of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids*. b.r. DOI: 10.1016/j.jfca.2011.08.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157511001943>
- [42] PRÍBELA, A. *Analýza potravin*. 1.vyd. Bratislava: STU, 1991. ISBN 80-227- 0374-5.
- [43] *Hmotnostní spektrometrie ve spojení se separačními technikami* [online]. Praha: VŠCHT, 2009 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Jelinek.pdf>
- [44] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. Brno: VUTium, 2000. ISBN 80-214-

1742-0.

- [45] SWADESH, Joel K. *HPLC: practical and industrial applications*. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. ISBN 9780849300035.
- [46] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [47] DANIEL, H. *Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts*. b.r. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00248-4. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503002484>
- [48] MUELLER, Gregory M. a Gregory M. GERALD F. *Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 00-804-7026-2.
- [49] BOEKHOUT, Teun a Vincent ROBERT. *Yeasts in food*. 1st ed. Cambridge England: Woodhead Publishing Ltd, 2003. ISBN 0-8493-1926-9.
- [50] *STUDYBLUE: yeast molecular taxonomy* [online]. California, b.r. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <https://www.studyblue.com/notes/n/yeast-molecular-taxonomy/deck/9823159>
- [51] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2010. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [52] BRODY, Jonathan R. a Scott E. KERN. *History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis*. b.r. DOI: 10.1016/j.ab.2004.05.054. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269704004932>
- [53] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTUČEK a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2008. ISBN 80 -210 -3841 -1.
- [54] GREEN, Stefan J., Raghavee VENKATRAMANAN, Ankur NAQIB a Victor M UGAZ. *Deconstructing the Polymerase Chain Reaction: Understanding and Correcting Bias Associated with Primer Degeneracies and Primer-Template Mismatches*. b.r. DOI: 10.1371/journal.pone.0128122. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0128122>
- [55] INNIS, Michael A. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Xviii. San Diego: Academic Press, 1990. ISBN 01-237-2181-4.
- [56] ERCOLINI, Danilo. *PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food*. b.r. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.11.006. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016770120300321X>
- [57] GLICK, Bernard R. a Jack J. PASTERNAK. *Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, 2010. ISBN 978-155-5816-124.
- [58] MOLNÁR, Orsolya, Michael WUCZKOWSKI a Hansjörg PRILLINGER. *Yeast biodiversity in the guts of several pests on maize; comparison of three methods: classical isolation, cloning and DGGE*. b.r. DOI: 10.1007/s11557-008-0558-0. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11557-008-0558-0>
- [59] DÍAZ, Mario, Mónica HERRERO, Luis A. GARCÍA a Covadonga QUIRÓS. *Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses*. b.r. DOI: 10.1016/j.bej.2009.07.013. Dostupné také z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X09002563>

- [60] KATSURAGI, Tohoru a Yoshiki TANI. *Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell sorting*. b.r. DOI: 10.1016/S1389-1723(00)88822-2. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172300888222>
- [61] KIMURA, K., M. YAMAOKA a Y. KAMISAKA. *Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence*. b.r. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.10.018. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701203003099>
- [62] ALVAREZ-BARRIENTOS, A., J. ARROYO, R. CANTON, C. NOMBELA a M. SANCHEZ-PEREZ. *Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology*. b.r. DOI: 10.1128/CMR.13.2.167-195.2000. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.13.2.167-195.2000>
- [63] PETRIK, S, I MÁROVÁ, A HÁRONIKOVÁ a E BREIEROVÁ. *Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production - a comparative screening study*. Berlín: Springer-Verlag, 2013, 8. ISSN 1590-4261.
- [64] ZOZ, Liliana, Julio Cesar CARVALHO, Vanete Thomaz SOCCOL, Thais Costa CASAGRANDE a Ligia CARDOSO. *Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics - a Review*. b.r. DOI: 10.1590/S1516-8913201400152. Dostupné také z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext)
- [65] VANĚK, Martin. *Studium karotenogenních kvasinek v průběhu růstu pomocí pokročilých instrumentálních technik*. Brno, 2017. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

|                           |  |
|---------------------------|--|
| AA/Bis                    | Akrylamid/ <i>N,N'</i> -methylenbis(akrylamid) |
| AMP                       | Adenosinmonofosfát                             |
| APS                       | Amonium persulfát                              |
| ATP                       | Adenosintrifosfát                              |
| BLAST                     | Basic local alignment search tool              |
| CoA                       | Koenzym A                                      |
| CoQ                       | Koenzym Q                                      |
| CTP                       | Cytosintrifosfát                               |
| <i>CYTB</i>               | Mitochondriálny gén cytochróm <i>b</i>         |
| CPD                       | Cyklobután pyrimidin diméry                    |
| D1/D2                     | Región veľkej podjednotky ribozomálnej DNA     |
| DGGE                      | Denaturačná gradientová elektroforéza          |
| dsDNA                     | Dvojvláknová DNA                               |
| EMS                       | Ethylester kyseliny methansulfonovej           |
| ETS                       | External transcription spacer                  |
| GC                        | Plynová chromatografia                         |
| GGPP                      | Geranyl-geranyl pyrofosfát                     |
| GTP                       | Guanintrifosfát                                |
| HMG-CoA                   | $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl CoA  |
| HPLC                      | Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia        |
| IPP                       | Isopentenyl pyrofosfát                         |
| ITS                       | Internal transcription spacer                  |
| LALS                      | Large angle light scattering                   |
| LSU                       | Veľká ribozomálna podjednotka                  |
| MVA                       | Mevalonová kyselina                            |
| MMS                       | Methylester kyseliny methansulfonovej          |
| NADPH/NADP <sup>+</sup>   | Nikotínamidadenín dinukleotidfosfát            |
| NTS                       | Non-transcribed spacer                         |
| PCR                       | Polymerázová reťazová reakcia                  |
| PDA                       | Detektor fotodiodového pola                    |
| <i>RPB1</i> a <i>RPB2</i> | Jednotky DNA polymerázy II                     |
| SALS                      | Small angle light scattering                   |
| ssDNA                     | Jednovláknová DNA                              |
| SSU                       | Malá ribozomálna podjednotka                   |
| TAG                       | Triacylglycerol                                |
| <i>TEF-1</i>              | Translačný elongačný faktor 1- $\alpha$        |
| TEMED                     | <i>N,N'</i> -tetramethylendiamin               |
| TRIS                      | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                 |