



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

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

STUDY OF RED YEAST METABOLISM ON MOLECULAR LEVEL

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Monika Roubalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0988/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Monika Roubalová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Studium metabolismu karotenogenních kvasinek na molekulární úrovni.

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) kultivace vybraných kmenů karotenogenních kvasinek rodů *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* na různých substrátech
- 2) izolace a charakterizace vybraných metabolitů a DNA
- 3) vliv chemické mutagenese na integritu kvasinkového genomu a metabolickou aktivitu

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. Monika Roubalová

studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

děkan

V Brně dne 31.1.2017

ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce je zaměřena především na molekulární charakterizaci vybraných druhů karotenogenních kvasinek. Metodou „nested“ PCR byly amplifikovány vysoce variabilní úseky kvasinkové DNA ITS1 a 5,8S-ITS2 a region D1/D2 kódující velkou ribozomální podjednotku (26S) rRNA. ITS jsou interní spacery ležící mezi sekvencí kódující malou a velkou podjednotku ribozomální DNA. Sekvenací dlouhého úseku rDNA za použití algoritmu BLAST byly porovnány karotenogenní kvasinky s databází NCBI a podle hodnoty tzv. „bit skóre“ byly kvasinky identifikovány. Identifikace karotenogenních kvasinek byly potvrzena i metodou DGGE.

Dalším cílem této práce bylo vybrat nejlepšího producenta karotenoidů a triacylglycerolů, kterým byl kmen *Rhodospiridium toruloides*. Tento kmen byl následně podroben fyzikální náhodné mutagenézi pod UV zářením. Výsledky produkce metabolitů *R. toruloides* byly porovnány s mutantními kmeny, které byly zároveň adaptovány na substráty glycerol a odpadní syrovátku. Mutantní kmen G33 je nejlepším producentem celkových karotenoidů s produkcí 7,14 mg/g biomasy. Nejvyšší produkci ergosterolu prokázal mutantní kmen Y34, množství produkovaného ergosterolu činí 47,72 mg/g biomasy. Žádný z vyselektovaných mutantních kmenů však nedokázal syntetizovat více β -karotenu (2,42 mg/g biomasy) ani TAG (76,32 mg/g biomasy) ve srovnání s původním kmenem *R. toruloides* rostoucím na glukózovém médiu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenogenní kvasinky, karotenoidy, molekulární charakterizace, mutagenéze.

ABSTRACT

This master thesis is focused on the molecular characterization of the eight red yeasts species. For molecular characterisation, the most variable rDNA regions ITS1, 5,8S ITS2 and the region encoding the large ribosomal subunit (26S) were amplified. This long region of the yeasts DNA was sequenced and compared by NCBI database for identification. The red yeasts identification was confirmed by data from DGGE method.

Another aim of this thesis was to select the best yeasts producer of carotenoids and triacylglycerols. *Rhodospiridium toruloides* was found as the best producer and, thus, this strain was subjected to random mutagenesis by UV irradiation. The results of the production of metabolites by *R. toruloides* were compared with mutant strains, which were also adapted to the glycerol and waste whey substrates. The mutant strain G33 was found as the best producer of total carotenoids with a yield of 7.14 mg.g⁻¹ of biomass. The highest production of ergosterol was demonstrated by the mutant strain Y34, the ergosterol yield was 47.72 mg.g⁻¹ of biomass. The wild type of *R. toruloides* was able to produce the highest amount of both β-carotene (2.42 mg.g⁻¹ of biomass) and TAG (76.32 mg.g⁻¹ of biomass) on glucose medium.

KEY WORD

Red yeast, carotenoids, molecular characterization, mutagenesis.

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

PROHLÁŠENÍ

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

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

V Brně dne

.....

Podpis autora

Poděkování

Na tomto místě bych ráda mockrát poděkovala prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc., za umožnění práce na této diplomové práci. Dále bych chtěla velmi poděkovat Ing. Ivetě Kostovové za čas, který mi věnovala při práci a za rady při psaní diplomové práce.

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Taxonomie kvasinek	9
2.2	Karotenogenní kvasinky.....	9
2.2.1	Rod <i>Rhodotorula</i>	11
2.2.1.1	Druh <i>Rhodotorula glutinis</i>	11
2.2.2	Rod <i>Sporobolomyces</i>	11
2.2.3	Biosyntéza karotenoidů mikroorganismy.....	12
2.2.4	Biosyntéza ergosterolu mikroorganismy.....	13
2.2.5	Regulace isoprenoidní dráhy	14
2.2.6	Biosyntéza triacylglycerolů mikroorganismy	14
2.2.6.1	<i>De novo</i> akumulace lipidů	15
2.2.6.2	<i>Ex novo</i> akumulace lipidů	16
2.2.6.3	Mitochondriální biosyntéza mastných kyselin	16
2.2.6.4	Regulace biosyntézy mastných kyselin	17
2.3	Metody molekulární charakterizace karotenogenních kvasinek	17
2.3.1	Identifikace kvasinek.....	17
2.3.1.1	Historie identifikace kvasinek	18
2.3.2	Izolace DNA.....	18
2.3.3	Gelová elektroforéza	18
2.3.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	19
2.3.4.1	„Nested“ PCR.....	19
2.3.4.2	Real-time PCR.....	19
2.3.5	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů	20
2.3.6	Denaturační gradientová gelová elektroforéza.....	21
2.3.7	Sekvenování DNA.....	21
2.3.7.1	Sangerova metoda sekvenování DNA.....	22
2.3.7.2	Pyrosekvenování DNA	22
2.3.7.3	Sekvenování DNA nové generace.....	22
2.3.7.4	Sekvenování DNA třetí generace	25
2.4	Náhodná mutageneze	25
2.4.1	Fyzikální mutageneze.....	25
2.4.2	Chemická mutageneze.....	26
2.4.3	Reparace DNA	26
2.4.3.1	Excizní opravy.....	26
2.5	Odpadní substráty	27
2.5.1	Odpadní syrovátka.....	27
2.5.2	Škrob	27
2.5.3	Odpadní glycerol	28
2.5.4	Výroba bionafty.....	28
3	CÍLE	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1	Použité chemikálie	31
4.1.1	„Drop“ test a kultivace kvasinek	31
4.1.2	Stanovení redukujících cukrů – Somogyi-Nelson.....	31

4.1.3	Izolace DNA a analýza DNA	31
4.1.4	Gelová elektroforéza	32
4.1.5	DGGE.....	32
4.2	Použité vybavení	32
4.2.1	RP-HPLC/PDA	32
4.3	Použité druhy kvasinek	33
4.4	Použité metody.....	33
4.4.1	Molekulární metody	33
4.4.1.1	Izolace DNA	33
4.4.1.2	„Nested“ PCR.....	34
4.4.1.3	Ethanolová precipitace PCR produktů	36
4.4.1.4	Gelová elektroforéza DNA.....	36
4.4.1.5	DGGE	37
4.4.1.6	Sekvence oblasti ITS1-5,8S-ITS2 a D1/D2.....	38
4.4.2	Kultivační metody	38
4.4.2.1	„Drop“ test.....	38
4.4.2.2	Kultivace karotenogenních kvasinek a odběr vzorků.....	39
4.4.2.3	Stanovení glukózy dle Somogyi – Nelsona.....	40
4.4.2.4	Izolace lipidů a karotenoidů extrakcí podle Folche.....	40
4.4.2.5	Enzymatické stanovení lipidů.....	41
4.4.2.6	Stanovení karotenoidů a ergosterolu pomocí RP-HPLC/PDA.....	42
4.4.3	Mutageneze	43
4.4.3.1	Průtoková cytometrie.....	44
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	45
5.1	Molekulární část.....	45
5.1.1	Izolace DNA, PCR a gelová elektroforéza.....	45
5.1.2	DGGE.....	47
5.1.3	Sekvence oblasti ITS1-5,8S-ITS2 a D1/D2.....	48
5.2	Fenotypová charakterizace.....	50
5.2.1	„Drop“ test.....	50
5.2.2	Morfologie buněk.....	52
5.2.3	Růstové charakteristiky	53
5.2.4	Produkce metabolitů.....	58
5.3	Mutageneze	62
5.3.1	Morfologické změny u mutantních kmenů	62
5.3.2	Průtoková cytometrie	63
5.3.3	Kultivace mutantních kmenů ve větším objemu	67
5.3.4	Stabilita genomu mutantních kmenů – DGGE.....	68
6	ZÁVĚR.....	70
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	71
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	79

1 ÚVOD

Karotenogenní kvasinky jsou řazeny převážně do oddělení *Basidiomycota*. Dále jsou řazeny do řádu *Sporidiobolales* a *Erythrobasidium* z pododdělení *Pucciniomycotina* a řádu *Cystofilobasidiales* a *Tremellales* z pododdělení *Agaricomycotina*. Mezi známé rody karotenogenních kvasinek patří *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium*, *Kockovaella* a *Phaffia*. Rody *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* jsou polyfyletické, nemají společného předka a sestávají z mikroorganismů z různých vývojových linií.

Jsou všudypřítomné, vyskytují se ve slané i sladké vodě, na rostlinách, jsou asociované s živočichy a také se často nachází v potravinách. Jsou charakteristické jejich schopností akumulovat v povrchových strukturách buněk karotenoidní pigmenty jako je β -karoten, γ -karoten, astaxanthin, torulen a torularhodin, které způsobují jejich žluté, oranžové a červené zbarvení, a proto se nazývají červené (karotenogenní) kvasinky. Avšak karotenoidy jsou akumulovány i v nepovrchových částech buňky (převážně se vyskytují v lipidových dropletách – „lipid bodies“). Dále jsou schopné akumulovat ergosterol, nenasycené mastné kyseliny, koenzymy Q10 i Q9 a další látky.

Skutečnost, že jsou schopné produkce karotenoidů a lipidů, vede k rozsáhlým biotechnologickým výzkumům karotenogenních kvasinek s cílem zajistit vysoké výtěžky těchto metabolitů za nejnižších finančních nákladů. Mikrobiální produkce karotenoidů v průmyslovém měřítku musí také splňovat podmínku neškodnosti pro životní prostředí. Získání vyšší produkce metabolitů lze docílit i náhodnou mutagenezí genomu kvasinek, hojně používaným mutagenem je UV záření o vlnové délce 265 nm, jelikož zde DNA vykazuje nejvyšší absorpci.

Karotenoidy patří k důležitým doplňkům stravy. Lykopen, α -karoten a β -karoten jsou prekurzory vitamínu A. Díky jejich antioxidační aktivitě hrají důležitou roli v prevenci a léčbě některých lidských nemocí, jako je například ateroskleróza. Torulen a torularhodin inhibují proliferaci rakoviny prostaty. V potravinářském průmyslu jsou karotenoidy použity jako barviva pro řadu aplikací od uzenin přes nealkoholické nápoje, cukrovinky, instantní potraviny až po pečivo.

Akumulace lipidů lze využít například k výrobě bionafty, která je vyráběna především z rostlinných olejů, což obnáší mnohé nevýhody, jako jsou velké potřebné plochy pro pěstování rostlin, náročnost na obsluhu a také nevyzpytatelnost podnebí. Kvasinky jsou tak potenciálním zdrojem biopaliv 3. generace.

Snížení výrobních nákladů lze dosáhnout použitím odpadních substrátů, které mohou kromě základního zdroje uhlíku obsahovat jiné živiny, například proteiny jako zdroj dusíku či soli. Mezi hojně používané odpadní substráty v biotechnologickém průmyslu patří syrovátka z mlékárenství, fritovací oleje, odpady z ovoce, zeleniny, cukrové třtiny či obilí.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Taxonomie kvasinek

Mezinárodní komise taxonomie hub (International Commission on the Taxonomy of Fungi ICTF) byla založena roku 1982. Jedná se o společnost, která propaguje práci na taxonomii a názvosloví říše *Mycota*, pomáhá šíření výsledků, rozvíjet pracovní skupiny a dobrou taxonomickou praxi [1].

Starý systém taxonomického rozdělení hub zahrnoval dvojí nomenklaturu, jednu pro *Eumycota* založené na sexuální morfologii (telemorf) a druhou pro *Deuteromycota* založené na asexuální morfologii (anamorf). Objev polymerázové řetězové reakce (PCR) roku 1983 [2] je klíčem ke sloučení názvosloví, i přes to nesou některé houby s pleomorfním životním cyklem dva názvy. Cílem dnešní taxonomie hub je řídit se pravidlem „One fungus = one name“ [3].

Taxonomická studie a evoluční vztahy byly odvozeny ze sekvencí sedmi genů, zahrnující geny pro malou ribozomální podjednotku (SSU) ribozomální DNA (rDNA), D1/D2 doménu velké ribozomální podjednotky (LSU) rDNA, ITS1 a ITS2 (interní prepisované mezerníkové oblasti = internal transcribed spacer) rDNA obsahující 5,8S rDNA gen; části genu RNA polymerázy II kódující dvě podjednotky (*RPB1* a *RPB2*) a translační elongační faktor 1- α (*TEF-1*); a mitochondriální gen cytochrom *b* (*CYTB*) [4]. Co se týče taxonomie, lze využít k doplnění i starších chemotaxonomických přístupů stanovením uhlovodíkového složení buněčné membrány, určením koenzymu Q, elektroforézou enzymů a analýzou mastných kyselin [5].

Kvasinky jsou jednobuněčné heterotrofní eukaryotické organismy spadající do říše hub (*Mycota*). Oddělení hub se dělí na *Basidiomycota*, *Microsporidia*, *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Glomeromycota* a *Ascomycota* [6]. *Basidiomycota* se dělí do tří linií *Pucciniomycotina*, *Ustilaginomycotina* a *Agaricomycotina* (dříve známy jako *Urediniomycetes*, *Ustilaginomycetes* a *Hymenomycetes*) (Obr. 1). Rody spadající do oddělení *Basidiomycota* se vyznačují různým složením koenzymu Q v závislosti na délce bočního izoprenového řetězce, tyto rody mají CoQ-7, CoQ-8, CoQ-9, CoQ-10 nebo CoQ-10(H₂) [5].

2.2 Karotenogenní kvasinky

Jedná se o různorodou skupinu nepříbuzných mikroorganismů, řazeny jsou převážně do oddělení *Basidiomycota*. Dále jsou řazeny do řádu *Sporidiobolales* a *Erythrobasidium* z pododdělení *Pucciniomycotina* a řádu *Cystofilobasidiales* a *Tremellales* z pododdělení *Agaricomycotina*. Mezi známé rody karotenogenních kvasinek patří *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium*, *Kockovaella* a *Phaffia*. Rody *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* jsou polyfyletické, nemají společného předka a sestávají z mikroorganismů z různých vývojových linií. Rod *Cystofilobasidium* je monofyletický [7].

Pododdělení hub *Pucciniomycotina* (z oddělení *Basidiomycota*) se vyznačuje typem buněčné stěny *Microbotryum*, která obsahuje především manózu, glukózu v menší míře, fukózu obvykle také obsahuje a někdy obsahuje i rhamnózu [5]. Zahrnuje celkem osm tříd, z nichž čtyři třídy kvasinek *Agaricostilbomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Microbotryomycetes* a *Mixiomycetes* a 28 rodů kvasinek, zahrnující 19 telemorfických a 9 anamorfických rodů. Většina těchto rodů jsou monofyletické a rody *Bensingtonia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* a *Sporobolomyces* jsou polyfyletické [4] [7] [8].

Třída *Agaricostilbomycetes* zahrnuje dva řády *Agaricostilbales* a *Spiculogloales*. *Spiculogloales* obsahuje rody *Mycogloea*, *Spiculogloea* a anamorfské druhy rodu *Sporobolomyces* (pro parte), jmenovitě *S. linderiae*, *S. coprosmicola*, *S. subbrunneus*, *S. dimmenae* a *S. novazealandicus* [4].

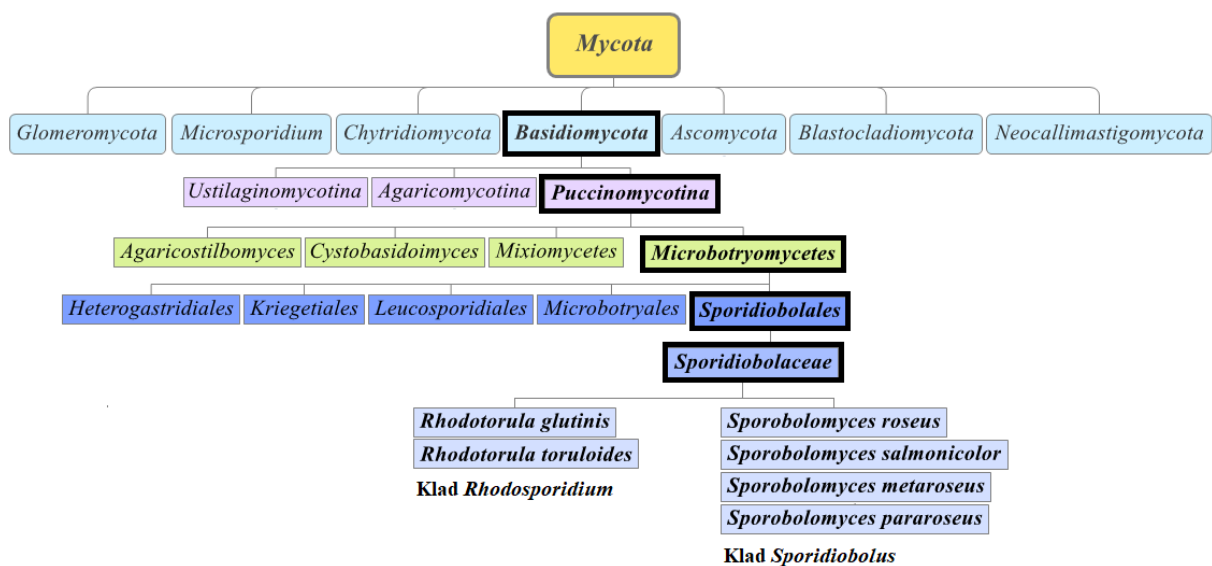
Třída *Cystobasidiomycetes* se skládá pouze z taxonů kvasinek a zahrnuje řády *Cystobasidiales*, *Erythrobasidiales* a *Naohideales*. Do *Cystobasidiales* patří teleomorfské rody *Cystobasidium* a *Occultifur* a některé anamorfské druhy rodu *Rhodotorula* [5].

Do třídy *Microbotryomycetes* byly zařazeny řády *Heterogastridiales*, *Kriegeriales*, *Leucosporidiales*, *Microbotryales* a *Sporidiobolales* na základě analýzy sekvence SSU (18S), LSU (26S) a ITS-5,8S rDNA. *Sporidiobolales* obsahuje tři klady *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus* a *Rhodosporidium/Sporidiobolus* [8]. Klad *Rhodosporidium* zahrnuje *Rhodotorula glutinis* a *Rhodosporidium toruloides* (obligátní synonymum *Rhodotorula toruloides*). Klad *Sporidiobolus* zahrnuje *Sporobolomyces salmonicolor*, *S. roseus*, *S. pararoseus*, *S. metaroseus* (Obr. 1) [4]. *S. shibatanus*, jehož aktuální název v databázi hub MycoBank je *Sporobolomyces japonicus*, se řadí do řádu *Sporidiobolales* [9].

Třída *Mixiomycetes* obsahuje pouze jeden druh *Mixia osmundae*, což je parazit kapradiny *Osmunda* [4].

Jedná se o všudypřítomné kvasinky, vyskytují se ve slané i sladké vodě, na rostlinách, jsou asociované s živočichy a také se často nachází v potravinách [10]. Jsou charakteristické jejich schopností akumulovat v povrchových strukturách buněk karotenoidní pigmenty jako je β -karoten, γ -karoten, astaxanthin, torulen a torularhodin, které způsobují jejich žluté, oranžové a červené zbarvení, a proto se nazývají červené (karotenogenní) kvasinky. Avšak karotenoidy jsou akumulovány i v nepovrchových částech buňky (převážně se vyskytují v lipidových dropletách – lipid bodies). Dále jsou schopné akumulovat ergosterol, nenasycené mastné kyseliny, koenzymy Q10 i Q9 a další. Akumulace lipidů lze využít k výrobě bionafty [11].

Existují i mikroorganismy z oddělení *Ascomycota* produkující karotenoidy, například *Gibberella zeae*, *Neurospora crassa* a *Fusarium fujikuroi* produkující neurosporaxanthin a torulen [12].



Obr. 1: Zařazení vybraných druhů karotenogenních kvasinek v taxonomii.

2.2.1 Rod *Rhodotorula*

Charles Harrison byl kanadský mikrobiolog, který jako první použil název *Rhodotorula* roku 1928. Jméno rodu pochází ze slova Rhodos (červená v řečtině) a Torula (výduť v neo-latině). Do té doby byl rod *Rhodotorula* přiřazován do rodů *Mycotorula*, *Torulopsis*, *Cryptococcus* a dokonce i *Saccharomyces* [13].

Rhodotorula je rod jednobuněčných karotenogenních kvasinek patřící do oddělení *Basidiomycota*, pododdělení *Pucciniomycotina*, avšak některé druhy patří do pododdělení *Ustilaginomycotina* (Obr. 1) [8]. Tento anamorfický rod je rozdělen celkem do 17 kladů, je tedy polyfyletický [4]. Její kolonie jsou rychle rostoucí, hladké, lesklé nebo matné, někdy zdrsňené, měkké a mukoidní. Jejich barva je růžová, korálově červená nebo žlutá. Dokáže produkovat charakteristické karotenoidy torulen, torularhodin a β -karoten [14]. Mezi známé druhy patří *Rhodotorula glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa* (známá jako *R. rubra*).

Zástupci tohoto rodu byly nalezeny v různých prostředích, včetně půdy, rostlin, odpadních vod, zkaženého jídla, vzduchu, hlubinných hydrotermálních průdušic a ledovců. Najdeme zde také mnoho extrémofilů tolerantních na podmínky jako jsou vysoká koncentrace solí, vysoký tlak, anaerobióza, vysoká koncentrace kovů, nízké pH do 1,5 a nízká teplota. Mezi tyto extrémofily patří *R. psychrophila*, *R. psychrophilica* a *R. glacialis* [15] [16]. Genom kvasinky rodu *Rhodotorula* kmene JG1b obsahuje 19,4 Mbp a je složen z 5 625 genů. Jedná se o první sekvenaci genomu kvasinky *Rhodotorula* přizpůsobenou na chladné prostředí [15]. Genom karotenogenní kvasinky *R. toruloides* obsahuje 20,05 Mbp [17].

Tento rod je považován za oportunní patogen, zejména u pacientů s oslabenou imunitou. Konkrétní případy zahrnují fungémii, endokarditidu, zánět pobřišnice, zánět mozkových blan spojený s infekcí způsobenou katetry a jinými intravenózními zařízeními [18]. Jedná se také o časté povrchové kontaminanty mléčných výrobků, masa, ovoce, zeleniny a pekárenských produktů [5].

Rhodotorula má potencionální využití v bioremediaci kontaminovaných vod. Hlavním cílem jsou vysoce toxické polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). Bylo zjištěno, že *R. glutinis* a *R. mucilaginosa* mají vysokou schopnost degradovat fenantren, zatímco *R. minuta* dokáže degradovat benzo[*a*]antracen [19].

2.2.1.1 Druh *Rhodotorula glutinis*

Významnou charakteristikou *R. glutinis* je schopnost produkovat četné enzymy, zejména fenylyalanin-amoniumlyasu (PAL). Tento enzym se používá v potravinářském průmyslu při výrobě L-fenylyalaninu, který tvoří substrát pro syntézu aspartamu, což je sladidlo běžně používané v potravinářském průmyslu [13]. Kvasinka byla použita k identifikaci kvasinkové biosyntézy L-lysinu pomocí L-pipekolové kyseliny. Vylučuje α -L-arabinofuranosidasu, které je důležitá ve vinařství pro aroma vína. Genom *R. glutinis* obsahuje 20,5 Mbp a obsah G/C párů je 61,9 % [20]. Biomasa z *R. glutinis* přidaná do krmiva pro krysy měla ochranné účinky proti prekancerózní lézi jater vyvolaným N-nitrosodimethylaminem [13].

2.2.2 Rod *Sporobolomyces*

Rod *Sporobolomyces* patří do pododdělení *Pucciniomycotina*, řádu *Sporidiobolales* (Obr. 1) [8]. Tento anamorfický rod je rozdělen celkem do 23 kladů, je tedy polyfyletický [4]. Nejznámější druhy jsou *Sporobolomyces roseus* a *S. salmonicolor*. Má elipsoidní až silně protáhlé buňky. Kolonie jsou vyzrálé asi v pěti dnech, optimální růstová teplota je 25–30°C. Jsou hladké, lesklé až matné, často vrásčité. Jsou jasně červené až oranžové. *Sporobolomyces*

produkuje pravé i nepravé hyfy a balistokonidie, které jsou bilaterálně symetrické. Produkují koenzymy Q10 i Q(H₂) [21].

2.2.3 Biosyntéza karotenoidů mikroorganismy

Karotenoidy jsou přirozeně se vyskytující, v tucích rozpustné pigmenty. Jsou velice cenné molekuly v různých průmyslových odvětvích, v chemickém, farmaceutickém, drůbežářském, potravinářském i kosmetickém. Produkce karotenoidů chemickou syntézou či extrakcí z rostlin a ovoce je omezena nízkými výtěžky, což vede k vysokým výrobním nákladům, proto v poslední době vzrostl zájem o biotechnologickou produkci karotenoidů mikroorganismy. Mikroorganismy produkující karotenoidy jsou bakterie, kvasinky, houby a řasy. Výhodou mikrobiální produkce karotenoidů je i jejich schopnost syntetizovat tyto látky ze zemědělských a průmyslových odpadních produktů, které obsahují nezbytné látky pro růst mikroorganismů, tímto se výrobní náklady produkce snižují a zároveň je zamezeno znečišťování životního prostředí těmito odpadními produkty.

Karotenoidy se vyskytují především ve fotosyntetických systémech vyšších rostlin, řas a fototrofních bakterií. V nefotosyntetizujících organismech jsou karotenoidy důležité při ochraně před fotooxidativním poškozením. Patří k důležitým doplňkům stravy. Jsou to přírodní barviva od žluté po červenou barvu, jejich zbarvení je způsobeno systémem konjugovaných vazeb. Karotenoidy lykopen, α -karoten a β -karoten jsou prekurzory vitamínu A a díky jejich antioxidační aktivitě hrají důležitou roli v prevenci a léčbě lidských nemocí, jako je ateroskleróza, roztroušená skleróza, šedý zákal a především rakovina [22]. Torulen a torularhodin inhibují růst rakoviny prostaty [23].

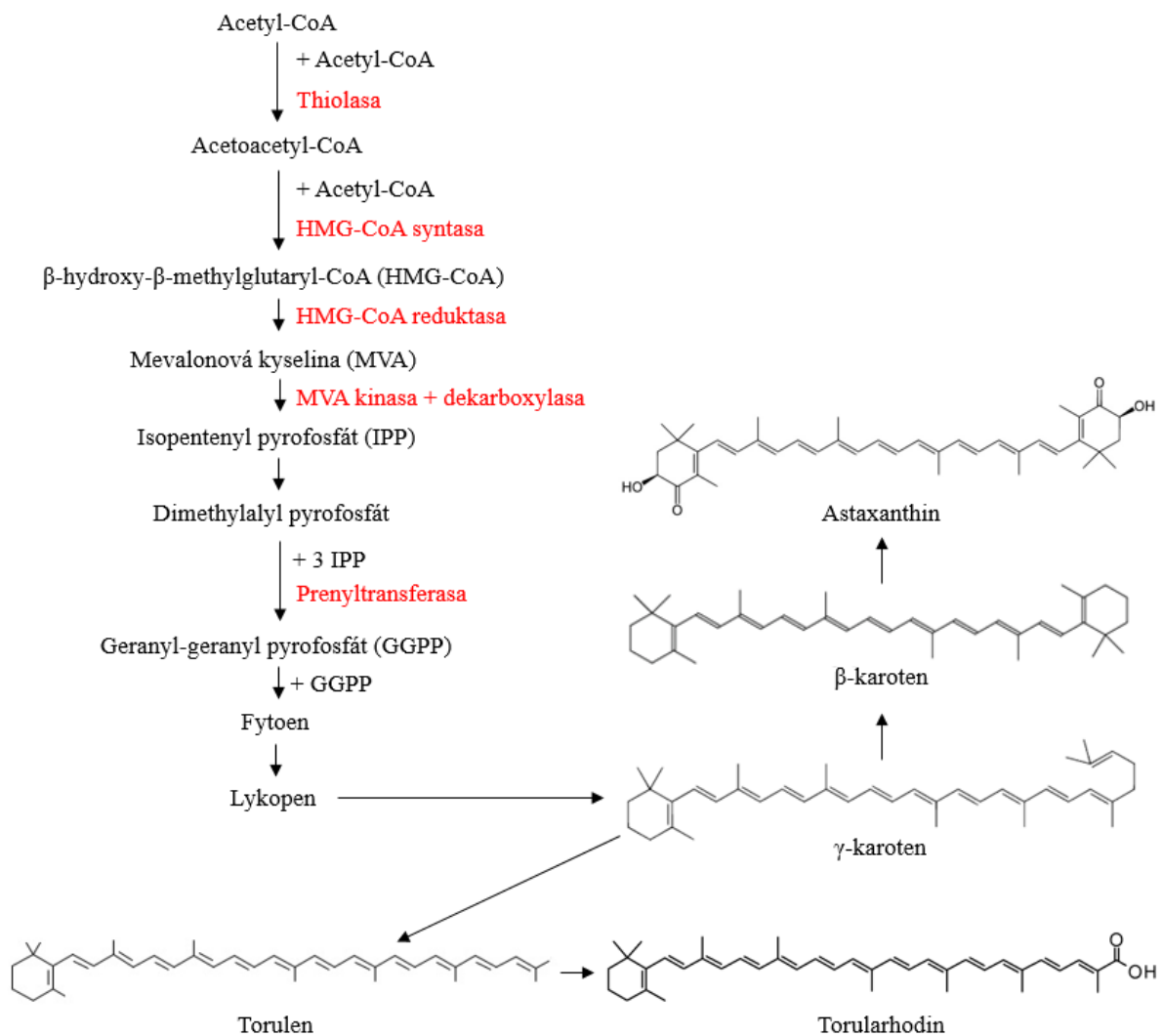
V potravinářském průmyslu jsou použity jako barviva pro uzeniny, nealkoholické nápoje a pečivo. Asthaxantin se přidává do krmiv pro vodní organismy, hlavně pro lososy, krevety a humry, k dosažení žádoucí pigmentace masa [22].

Sekundární metabolity v podobě karotenoidů jsou deriváty C₄₀ isoprenoidů a terpenoidů. Karotenoidy jsou produkovány v jedné ze specifických větví isoprenoidní dráhy. Výchozí látkou biosyntézy isoprenoidů, a tedy i karotenoidů kvasinkami je acetyl-CoA, postupnou kondenzací jeho molekul vzniká acetoacetyl-CoA a následně β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), jehož redukcí vzniká mevalonová kyselina (MVA), první prekurzor biosyntézy terpenoidů. MVA je fosforylována za katalýzy MVA kinasou a dekarboxylována za vzniku isopentenyl pyrofosfátu (IPP). Jedna molekula IPP je přeměněna na jeho isomer dimethylalyl pyrofosfát (DMAPP). Kondenzací jedné molekuly DMAPP a tří molekul IPP za katalýzy prenyltransferasy vznikne C₂₀ diterpen geranyl-geranyl pyrofosfát (GGPP). Kondenzací dvou GGPP vzniká acyklický bezbarvý karotenoid fytoen, první C₄₀ karotenoid, z kterého vzniká světlo absorbující lykopen a následně γ -karoten, β -karoten, torulen, torularhodin a astaxanthin (Obr. 2) [11] [22].

Mikrobiální produkce karotenoidů v průmyslovém měřítku musí splňovat podmínky pro nízký náklad procesů, vysoký výnos a neškodnost pro životní prostředí. Faktory ovlivňující produkci a výnos karotenoidů jsou vhodný zdroj uhlíku, dusíku a fosforu, světlo, teplota, aerace, ionty kovů a solí (Ba, Fe, Mg, Ca, Zn a Co) a vhodné rozpouštědlo [22]. Nejvíce studovaný parametr ovlivňující biosyntézu karotenoidů je zdroj uhlíku v médiu. Nejvíce používaná je glukóza a jiné fermentovatelné cukry, ty jsou metabolizovány glykolýzou. V článku Gu, An a Johnsona (1997) demonstrovali, že přídavek ethanolu (0,2 %) do kultury kvasinky *Phaffia rhodozyma* způsobilo zvýšení specifické rychlosti produkce karotenoidů, tato zvýšená produkce je spojena s indukci HMG-CoA reduktasy [22] [24].

β -karoten (β - β' -karoten) se používá jako potravinářské barvivo nebo jako doplněk stravy, který působí jako provitamin A v koncentraci od 2 do 50 ppm. Torulen (3', 4'-dehydro- β , ψ -karoten) obsahuje 13 konjugovaných dvojných vazeb, proto má vyšší antioxidační aktivitu než β -karoten, který má o konjugovanou vazbu méně. Astaxantin (3, 3'-dihydroxy- β , β karoten-4,4'-dion) je červený pigment, který způsobuje zbarvení mořských bezobratlovců, ryb a ptáků [22].

V článku Bagy *et al.* (2016) použili *R. glutinis* izolovanou z egyptského jetele k získání vysokého výtěžku β -karotenu při rozdílných růstových podmínkách a při různém složení živin. Dosáhli velmi vysokého výtěžku 204,29 mg/l β -karotenu za následujících podmínek: jako C-substrát odpad z cibule 50 g/l; kvasničný extrakt 1,5 g/l; KH_2PO_4 2,5 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l, L asparagin 0,1 g/l, inkubace po dobu 48 hodin při 35°C [25].



Obr. 2: Schéma biosyntézy karotenoidů produkovaných karotenogenními kvasinkami. Červeně jsou značeny enzymy katalyzující reakce [22].

2.2.4 Biosyntéza ergosterolu mikroorganismy

Ergosterol je důležitou součástí membrán hub a protozoí, kde se podílí na mnoha fyziologických funkcích, jako je například regulace fluidity a propustnosti membrány, aktivita a distribuce integrálních proteinů a kontrola buněčných cyklů.

Ergosterol je biologický prekursor vitamínu D₂, ergokalciferolu. Vystavení ergosterolu ultrafialovému záření způsobuje fotochemickou reakci, která jej převede na ergokalciferol. Ergosterol lze extrahovat a převést na vitamin D₂ za účelem prodeje jako doplňku stravy a potravinářských přídatných látek.

Geny zapojeny v biosyntéze ergosterolu u hub jsou značeny *ERG* a je jich známo okolo 20. Základní stavební jednotkou biosyntézy ergosterolu je acetyl-CoA. V první fázi syntézy vzniká isopentenyl pyrofosfát mevalonátovou drahou. V druhé fázi kondenzuje šest IPP přes farnesyl pyrofosfát na skvalen za katalýzy skvalensynthasy v endoplasmatickém retikulu a v poslední fázi skvalen cyklizuje na tetracyklický steroid přes epoxyskvalen na lanosterol. Dále probíhá jedenáctikroková transformace na ergosterol přes zymosterol, fekosterol, episterol a další. Pro biosyntézu jedné molekuly ergosterolu je potřeba 12 molekul O₂ [26].

2.2.5 Regulace isoprenoidní dráhy

Mevalonátová dráha známá jako obecná část isoprenoidní cesty je základní metabolická cesta přítomná prakticky u všech organismů – eukaryot, archaeí a některých bakterií. Cesta produkuje isopentenylpyrofosfát a dimethylallylpyrofosfát z acetyl-CoA, což jsou meziproducty isoprenoidů, různorodé třídy více než 30 000 biomolekul, jako jsou steroly sitosterol, cholesterol a ergosterol, hem, karotenoidy, vitamin K, koenzymy a veškeré steroidní hormony.

Farnesylpyrofosfát (FPP) je tvořen z mevalonátu v reakci katalyzované FPP-synthasou (*Erg20p*). Regulace *Erg20p* organismu *Saccharomyces cerevisiae* byla zkoumána metodou dvouhybridního systému studující interakce mezi proteiny, a bylo určeno pět interagujících proteinů včetně proteinu Yta7p ze skupiny AAA ATPas. Ukázalo se, že odstranění enzymu Yta7p má vliv na enzymatickou aktivitu cis-prenyltransferasy, což je enzym využívající FPP pro biosyntézu dolicholu. Mutantní buňky jsou také přecitlivělé na lovastatin, inhibitor β-hydroxy-β-methylglutaryl-CoA reduktasy (HMGR), která působí proti FPP-synthase v isoprenoidní dráze. Také kyselina zaragozová, inhibitor skvalensynthasy, změnila expresi genu *S. cerevisiae* *YTA7* s výsledným zhoršením aktivity biosyntézy isoprenoidů [27].

2.2.6 Biosyntéza triacylglycerolů mikroorganismy

Metabolismus lipidů zahrnuje několik buněčných organel – endoplasmatické retikulum, mitochondrie, peroxisomy a také lipidové droplety.

Mikroorganismy akumulující lipidy se nazývají také oleogenní mikroorganismy. Jsou definovány jako mikroby s obsahem látek lipidické povahy vyšším než 20 % jejich suché hmotnosti. Tyto organismy a jejich lipidy jsou označovány zkratkou SCO (single cell oils). Kvasinky rodů *Rhodotorula* sp. a *Lipomyces* sp. dokáží za správných podmínek intracelulárně nashromáždit až 70 % lipidů [28]. Tyto lipidy nacházejí využití v biotechnologickém průmyslu, a to k výrobě bionafty, jedním z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších biopaliv dnešní doby. Jedná se o ekologické palivo pro vznětové motory (takzvané diesely) na bázi alkylesterů vyšších mastných kyselin (především methyl a ethyl esterů – FAME, FAEE). Vyrábí se transesterifikací především z rostlinných, ale i živočišných olejů (hlavně tedy z řepkového, slunečnicového, sójového, ale také z použitých fritovačích olejů z ekonomických důvodů). V článku amerických vědců Blazek *et al.*, 2014 o využití lipogeneze *Yarrowia lipolytica* k vytvoření platformy pro produkci lipidů a biopaliv. Genotyp a fenotyp houby *Yarrowia lipolytica* byl optimalizován k vytvoření kmene s významnou schopností lipogeneze. Této studii byl připraven kmen s 460krát lepší akumulací lipidů *de novo* ve srovnání s výchozím kmenem. V rámci studie bylo identifikováno několik jedinečných vlastností lipogeneze

vedoucích k akumulaci lipidů blížící se až 90 % buněčné hmoty. Výsledky studie tak potvrzují, že mikrobiální produkce vyšších mastných kyselin může nahradit proces výroby bionafty z rostlinných olejů s podobným profitem [29].

Biosyntéza triacylglycerolů (TAG) mikroorganismy lze rozdělit na *de novo* a *ex novo* akumulaci lipidů [28] [30].

2.2.6.1 *De novo* akumulace lipidů

Jsou-li v médiu zdrojem uhlíku cukry, jedná se o *de novo* akumulaci lipidů. K dosažení hromadění lipidů u oleogenních mikroorganismů je třeba, aby byl v kultivačním médiu vyčerpán dusík. Buňka stále asimiluje uhlík, kterého je v médiu přebytek (nejčastěji glukózu). Uhlík je buňkou převeden do podoby triacylglycerolů, což se ovšem děje i v přítomnosti dusíku v takřka stejném tempu, avšak jeho nepřítomnost brání buňkám v proliferaci a syntetizované lipidy se tak ukládají a hromadí ve stávajících buňkách [28].

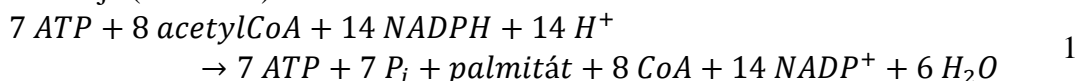
Pravděpodobně dva nejdůležitější regulační enzymy v roli ukládání enzymů jsou malátový (jablečný) enzym a ATPcitrátlyasa (ACL), avšak u některých kvasinek není ACL nezbytná. ACL je odpovědná za tvorbu cytoplasmatického acetyl-CoA, hlavního prekurzoru biosyntézy lipidů. Malátdehydrogenasa je zodpovědný za přítomnost NADPH. Zdrojem NADPH je také pentózofosfátová dráha [28].

Jedinečná vlastnost spojená s oleogenními organismy je, že aktivita isocitrátdehydrogenasy (v TCA cyklu) je závislá na přítomnosti AMP, přičemž tato závislost se nevyskytuje u neoleogenních MO. Pokud je dusík vyčerpán, dochází k rychlému poklesu vnitrobuněčné koncentrace AMP. To má za následek změnu v Krebsově cyklu s inhibicí isocitrátdehydrogenasové činnosti a akumulaci citrátu, dokud se nedosáhne kritické hodnoty. Za tímto bodem citrát vstoupí do cytoplazmy přes trikarboxylátový transportér výměnou za malát a je rozštěpen ACL na acetyl-CoA a oxalacetát [28].

Biosyntéza mastných kyselin probíhá hlavně v cytosolu a začíná nevratnou karboxylací acetyl-CoA na malonyl-CoA enzymem acetyl-CoA-karboxylasa (ACC), obsahující kovalentně navázaný biotin přes ϵ -amino skupinu lysinu. Tato dvoukroková reakce začíná ATP-dependentním přenosem HCO_3^- na biotin a poté přenosem CO_2 na acetyl-CoA. ACC je lokalizován na vnější straně cytoplasmatické membrány endoplasmatického retikula [31]. Metabolizace malonyl-CoA dále pokračuje na multienzymovém komplexu synthasy mastných kyselin (FAS) složeném z α (Fas2) a β (Fas1) podjednotek. β podjednotka zahrnuje funkce acetyltransferasu, enoyl reduktasu, dehydratasu a malonyl-palmitoyl transferasu a α podjednotka představuje „acyl carrier protein“ (ACP), β -oxoreduktasu, β -oxosyntasu a fosfopanteteinyl transferasu [30]. Na dvě SH- skupiny na FAS jsou navázány acylové skupiny, jedna z acetyl-CoA, katalyzována acetyl-CoA-ACP transacetylasou, a druhá z malonyl-CoA, katalyzována malonyl-CoA-ACP transferasou. Následuje kondenzace malonyl-ACP a acetyl-ACP za tvorby CO_2 a acetoacetylu vázaného na fosfopanthoteinovou skupinu ACP, katalyzována β -oxoacyl-ACP-synthasou. Acetoacetyl-ACP je redukován na β -karbonylové skupině za vzniku D- β -hydroxybutyryl-ACP, tato reakce je katalyzována β -oxoacyl-ACP-reduktasou a donorem H^+ a elektronů je NADPH. Při β -oxidaci mastných kyselin vzniká rozdílný stereoisomer L- β -hydroxyacyl. Další krok katalyzuje hydroxyacyl-ACP-dehydratasa a vzniká dvojná vazba mezi α a β uhlíky, výsledkem je intermediát *trans*- Δ^2 -butenoyl-ACP a nakonec je tato dvojná vazba redukována na butyryl-ACP za katalýzy enoyl-ACP-reduktasou, koenzymem reakce je opět NADPH. Butyrát je odštěpen

od ACP palmitoylthioesterasou, ten do dráhy vstoupí znovu jako butyryl-CoA a je prodlužován o další dva uhlíky stejně jako acetyl-CoA až do vzniku palmitátu (C₁₆) [30].

Prodlužování acetyl-CoA o dva uhlíky se v cytosolu buňky opakuje sedmkrát, sumární rovnice reakce je (rovnice 1)



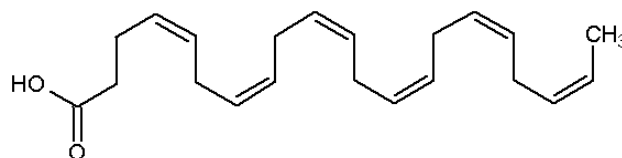
Pro potřebu delších mastných kyselin je palmitát transportován do endoplasmatického retikula, kde se tvoří MK až do délky C₂₆. Reakční schéma je velmi podobné cytosolické syntéze MK s rozdílem, že syntéza neprobíhá na jednom komplexu, ale enzymy jsou samostatně v membráně ER a místo ACP je použit koenzym A. Minoritně probíhá prodlužování MK i v mitochondriích na systému FAS typu II [30].

2.2.6.2 *Ex novo* akumulace lipidů

Ex novo biosyntéza TAG probíhá na médiu, kde zdrojem uhlíku jsou mastné kyseliny a hydrofobní materiály. Dusík není vyčerpán, takže akumulace lipidů je spojena s růstem buňky. Jako substrát mohou být použity volné mastné kyseliny, zeleninový olej, průmyslové tuky nebo rybí tuk [28].

Degradace hydrofobních substrátů zahrnuje sekreci lipáz MO, které katalyzují hydrolyzu substrátu na volné mastné kyseliny, které jsou do mikrobiální buňky začleněny pomocí aktivního transportu nebo volné difúze v případě vysokého koncentračního gradientu. Tyto mastné kyseliny jsou využity k růstu buňky nebo jsou transformovány k produkci jiných mastných kyselin [32].

Syntetasa mastných kyselin a ACL je silně inhibována přítomností mastných kyselin, proto nemohou procesy *de novo* a *ex novo* probíhat zároveň. Výjimkou je kvasinka *Pichia methanolica*, která akumuluje tuky v přítomnosti glukózy a TAG bohatých na dokosahexaenovou kyselinu (DHA, Obr. 3: Dokosahexaenová kyselina.), jedná se o polynenasycenou mastnou kyselinu, esenciální pro člověka a nezbytnou pro správný vývoj mozku [28].



Obr. 3: Dokosahexaenová kyselina.

2.2.6.3 Mitochondriální biosyntéza mastných kyselin

V mitochondriích probíhá syntéza mastných kyselin na systému FAS typu II. Kvasinkové mutantní kmeny s deficitem mitochondriální syntézy MK jsou životaschopné a prototrofní vůči MK, to znamená, že není důležitá pro hromadnou akumulaci MK. Nicméně tyto mitochondriální mutanti jsou neschopní respirace, což naznačuje, že produkty mitochondriální syntézy MK jsou nezbytné pro funkci mitochondrií, tato funkce nelze obnovit ani suplementací mastnými kyselinami či lipoovou kyselinou, jelikož transport těchto sloučenin do mitochondrií chybí i přesto, že obsahuje pět karnitin-*O*-acetyltransferas (Yat1, Yat2, Crc1, Agp2 a Cat2) [30].

Hlavní úlohou syntézy MK v mitochondriích je poskytnout oktanoyl-ACP, prekurzor pro lipoovou kyselinu, nezbytný kofaktor v oxidačních dekarboxylačních reakcích [30].

2.2.6.4 Regulace biosyntézy mastných kyselin

Kvasinková acetyl-CoA karboxylasa (acetyl-CoA:karbon-dioxidligasa; E.C. 6.4.1.2) je 250 kDa protein, je kódován *ACC1* genem lokalizovaným na chromozomu XIV (kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* jako modelový organismus). Regulace aktivity enzymu *Acc1* v kvasinkách probíhá na genové a proteinové úrovni [30].

ACC1 genová exprese je regulována v koordinaci s fosfolipidovou biosyntézou jako odpověď na lipidové prekurzory inositol a cholin na úrovni transkripce, ta je kontrolována transkripčními faktory *Ino2 / Ino4* a *Opi1*. Exprese *ACC1* je závislá na acetylaci histonů a je regulována SAGA komplexem a TFIID. Experimenty na DNA mikročipech ukazují závislost exprese *ACC1* na fázi buněčného cyklu, kde je maximální exprese na začátku G1 fáze. Zvýšená exprese enzymů *Acc1* i *Bpl1* (biotin:apoprotein-ligasa) způsobuje umrtvení buněk, pravděpodobně v důsledku nerovnoměrné syntézy mastných kyselin s (velmi) dlouhým řetězcem nebo z důvodu vyčerpání meziproduktů [30].

Absence *Sit4*-fosfatasy způsobuje přecitlivělost proteinu *Acc1* na inhibitor soraphen A, což zapříčiňuje vysokou fosforylaci *Acc1* a tím jeho inaktivaci [30].

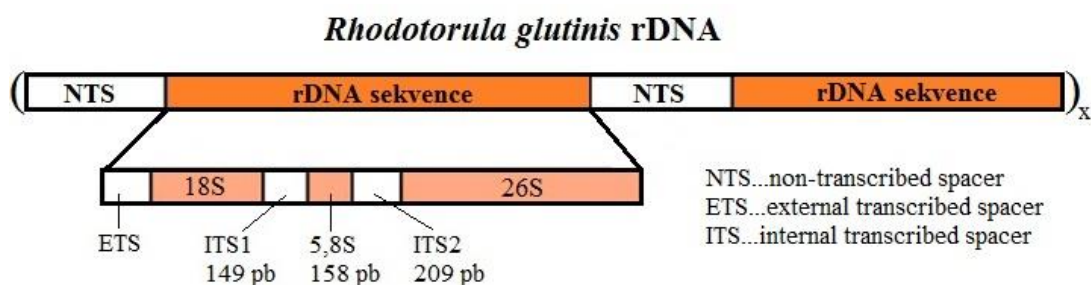
2.3 Metody molekulární charakterizace karotenogenních kvasinek

Klasické metody identifikace druhů kvasinek jsou založeny na morfologických, fyziologických a biochemických vlastnostech. Standardní metody vyžadují řadu kultivačních testů, jakými jsou hodnocení vzhledu a tvaru kolonií, sporulace a morfologie buněk, testy schopnosti asimilace zdrojů uhlíku a dusíku, požadavky na přítomnost vitamínů, schopnosti zkvašovat cukry, dále různé nároky kvasinek na teplotu prostředí, koncentraci cukrů a solí [5].

2.3.1 Identifikace kvasinek

Druhy kvasinek jsou běžně identifikovány sekvenováním úseků ribosomální DNA (rDNA), což je úsek DNA, který kóduje ribosomální RNA (rRNA). Kvasinková rDNA je složena z genů kódujících malou (18S), 5,8S a velkou (26S) podjednotku ribosomální DNA, oddělenou pomocí ITS1 a ITS2 regionů (interní přepisované mezerníky = internal transcribed spacer) (Obr. 4). Kvasinkový genom obsahuje mnoho kopií rDNA, například genom *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje 100–140 genů kódující ribosomální RNA a *Candida* jich má 50–100 [33]. Kvasinkový genom obsahuje ITS1 a ITS2 regiony, které jsou odděleny 5,8S rDNA. Regiony ITS1, ITS2 a D1/D2 náležící na 26S jsou mnohem variabilnější než sousední rDNA sekvence genu, a tak zabezpečují lepší oddělení blízké příbuzných druhů, proto je nejvíce sekvenovaný úsek DNA u hub [34]. V článku vědců Leaw *et al.* (2006) identifikovali sekvenací oblastí ITS1 a ITS2 96,8% (361 z 373) a 99,7% (372 z 373) druhů kvasinek. Z 373 testovaných druhů pouze jeden druh *Rhodotorula glutinis* nebylo možné identifikovat analýzou sekvenací ITS2 regionu. Tato data naznačují, že ITS2 sekvence jsou více druhově specifické než ITS1 sekvence [35].

Základní postup při identifikaci a taxonomii kvasinek zahrnuje izolaci DNA z kvasinkových kultur, PCR amplifikaci vybraných genových sekvencí, separaci a izolaci amplifikované DNA, sekvenaci produktu a jeho porovnání s databází, nejčastěji jsou porovnávány s databází GenBank pomocí algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).



Obr. 4: Kvasinková ribozomální DNA, ITS1-5,8S-ITS2 region specifický pro kvasinku *Rhodotorula glutinis* [36].

2.3.1.1 Historie identifikace kvasinek

Asi před 70 lety Wickerham popsal metodu testování kvasinek pomocí asimilace a fermentace v tekutém médiu v aerobních podmínkách. Asimilační testy určují schopnost využití substrátů jako jediného zdroje uhlíku (např. sacharózu) nebo dusíku (např. KNO_3). Tento laboratorní test se nazývá auxanogram (z řečtiny řeckých slov auxanó = rostou, grafein = psát). Metoda byla používána pro definitivní charakterizaci a taxonomii kvasinek. Většina Wickerhamových médií nejsou komerčně dostupné, je to dlouhý a náročný proces a v dnešní době se používá minimálně. Jelikož mnoho kvasinek je přeočkováno z živných médií, je potřeba porovnání s negativní kontrolou pro každý typ testu a organismu. Metoda je časově náročná a trvá až po dobu 4 týdnů. Asimilační testy sledují zákal a fermentační testy kontrolují výrobu plynu. Metoda je nevhodná pro použití v rutinní laboratoři [33].

Praktičtější a rychlejší auxanografie byla vyvinuta na agarových plotnách s kulturou kvasinek za použití cukrem napuštěných papírových disků nebo sypaných hromádek uhlíkových zdrojů na půdu. Přidání pH indikátoru bromkresolový purpur na plotnu usnadnilo interpretaci zákalu [33].

2.3.2 Izolace DNA

Prvním krokem k charakterizaci mikroorganismů je izolace a purifikace DNA z jejich buněk především extrakčními metodami. Je zapotřebí získat nukleovou kyselinu v nativním stavu separovanou od ostatních komponent nacházejících se v buňce. Izolace DNA zahrnuje lýzi buněk enzymatickou degradací zymolasou nebo lytikasou či mechanickým narušením skleněnými kuličkami, odstranění RNA pomocí RNAsy, extrakcí směsí fenol-chloroform získáme vodný roztok deoxyribonukleové kyseliny bez proteinů, dále alkalickou reverzibilní denaturací se oddělí plazmidová DNA od chromozomové DNA [32].

2.3.3 Gelová elektroforéza

Pro elektroforézu nukleových kyselin se používají gely z polyakrylamidu či agarózy nejčastěji v horizontálním uspořádání. Vhodně zvoleným složením roztoku a koncentrace polymeru lze dosáhnout určité velikosti pórů v síťové struktuře, a tak separovat molekuly DNA dle dané velikosti. Gelovou elektroforézou lze ověřit úspěšnost izolace DNA či odhadnout její velikost v porovnání s hmotnostním standardem. DNA je na gelu vizualizováno etidiumbromidem, které po ozáření UV světlem červeně fluoreskuje.

2.3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metodou PCR lze několikanásobně namnožit úsek DNA. V termocykleru lze cyklicky měnit teploty a tím dosáhnout opakující se replikace DNA. PCR postupně zahrnuje kroky: denaturace dsDNA (94°C), připojení primerů k ssDNA (30–65°C) a nasyntetizování druhého vlákna pomocí termostabilní *Taq* DNA-polymerasy z bakterie *Thermus aquaticus* (65–75°C), reakční směs musí obsahovat směs nukleotidtrifosfátů ATP, GTP, TTP a CTP. Po třiceti cyklech daný úsek dsDNA vytváří přes miliardu kopií podle výpočtu 2^n , kde n je počet cyklů.

2.3.4.1 „Nested“ PCR

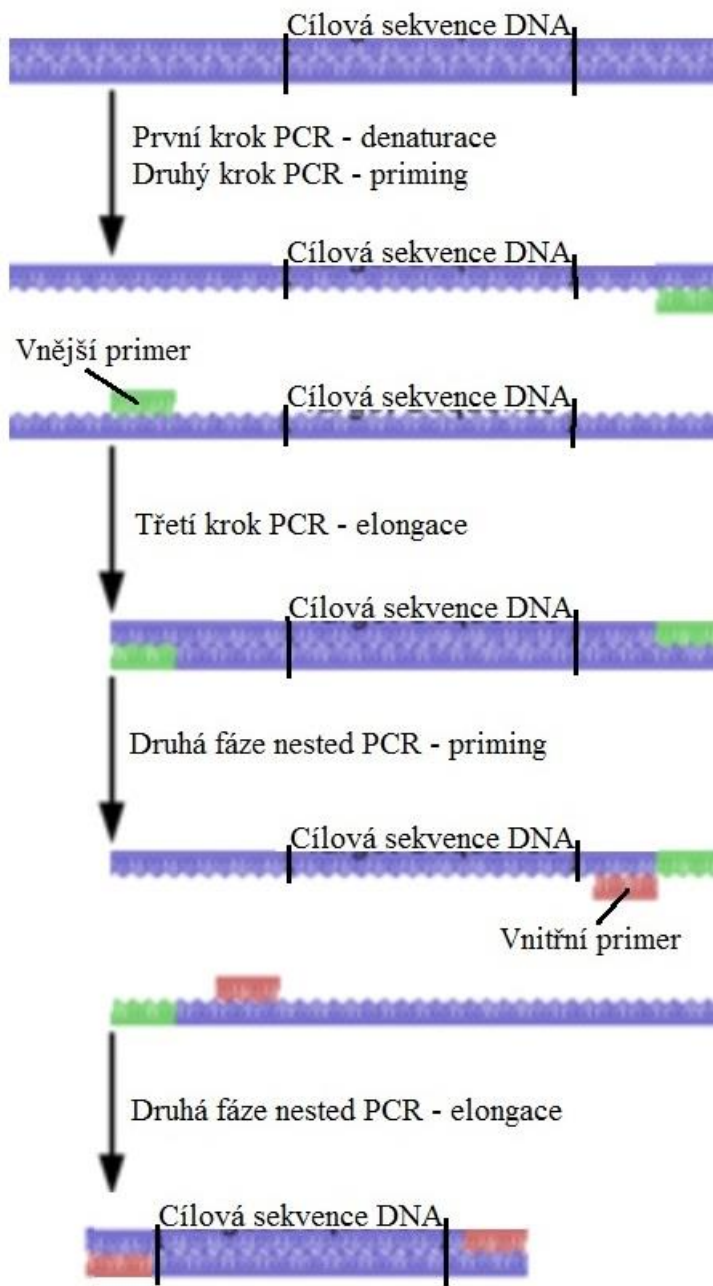
Jedná se o jednu z mnoha typů metod PCR, zahrnující dvě sady primerů, a to vnitřní a vnější primery. Amplifikace DNA probíhá dvoufázově. V první fázi je pomocí vnější sady primerů vymezen z dlouhého fragmentu DNA určitý lokus, v druhé fázi jsou použity vnitřní primery k amplifikaci požadovaného úseku DNA. Tato metoda se používá díky své citlivosti a specifitě, kdy výběrem vhodných primerů lze namnožit požadovaný úsek DNA, je totiž velmi nepravděpodobné, že by některý z nežádoucích produktů PCR obsahoval vazebná místa pro obě sady primerů (Obr. 5) [37].

„Nested“ PCR nachází využití při identifikaci a taxonomickém zařazení kvasinek, kde jsou nejčastěji amplifikovány hypervariabilní oblasti DNA ITS1, ITS2 a oblast velké ribosomální jednotky (26S) D1/D2. V první fázi amplifikace úseků ITS1 a ITS2 jsou použity vnější primery ITS1 a ITS4. V druhé fázi jsou použity vnitřní primery ITS2 a ITS3 tak, že oblast ITS1 je amplifikována mezi primery ITS1 a ITS2 a oblast ITS2 oddělují primery ITS3 a ITS4. Při amplifikaci D1/D2 oblasti jsou jako vnější primery použity NL1 a NL4 a v druhé fázi je požadovaný úsek DNA oddělen mezi primery NL1 a LS2 [37].

2.3.4.2 Real-time PCR

Další modifikací PCR je kvantitativní RT-PCR, ta kombinuje PCR amplifikaci a detekci na bázi fluorescence. Amplifikace DNA probíhá v termocykleru vybaveným optickým zařízením pro snímání intenzity fluorescenčního zařízení ze sond ve skutečném čase po jednotlivých cyklech amplifikace. Detekce amplifikovaného produktu je možno získat různými způsoby: (1) použitím SYBR Green barvivem, které se interkaluje do dsDNA, má dobrou citlivost, ale nedostatek specifčnosti; (2) použitím fluorescenční hybridizační sondy nebo TaqMan sondy, které se specificky vážou k dané sekvenci uvnitř amplifikovaného produktu; (3) analýzou křivky tání k definování teploty tání amplifikovaného produktu, které závisí na % GC párů vzhledem k délce templátu DNA [33].

TaqMan je oligonukleotid, který se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom svém konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhášečem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymerasa fluorochrom od TaqMan sondy a dojde k nárůstu fluorescence [33].



Obr. 5: Schéma podstaty „nested“ PCR. Převzato a upraveno z [38].

2.3.5 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

Jednou z metod identifikace DNA je její restrikční analýza pomocí restrikčních endonukleas (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP). Tyto enzymy štěpí DNA na fragmenty v palindromatických sekvencích. Restrikční fragmenty jsou následně rozděleny gelovou elektroforézou. RFLP je hojně používána v genetickém inženýrství při mapování genomu, lokalizaci genů při genetických poruchách, stanovení rizika pro onemocnění a testování otcovství.

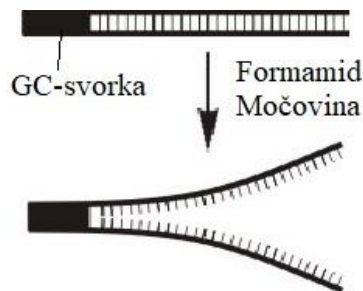
RFLP je technika založená na PCR amplifikaci DNA. Pro identifikaci mikroorganismů jsou nejčastěji amplifikovány úseky 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S rDNA. Amplifikovaná DNA je rozštěpena restrikčními enzymy. Výsledné DNA fragmenty jsou rozděleny pomocí elektroforézy a následně mohou být přeneseny na nitrocelulózovou membránu prostřednictvím

Southern blotu. Po rozdělení vzniklých fragmentů lze na základě velikosti a počtu fragmentů sledovat rozdíly ve studovaných sekvencích, tzv. polymorfizmy. Kvasinka *R. glutinis* byla touto technikou identifikována jako oportunní patogen v hovězí intramamární infekci [39].

2.3.6 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) je vhodná metoda k identifikaci mikroorganismů a také k vyhledávání mutací. Jedná se o metodu otisku prstu a spočívá v postupné denaturaci vodíkových vazeb mezi vlákny DNA. Polyakrylamidový gel s denaturačním gradientem obsahuje zvyšující se koncentrace denaturujících látek formamidu a močoviny, ty denaturují vodíkové vazby mezi nukleotidovými páry v dsDNA (Obr. 6), úseky DNA bohaté na AT páry budou lépe denaturovat než úseky DNA s vysokým obsahem GC párů, protože páry AT jsou spojeny dvěma vodíkovými vazbami a páry GC jsou spojeny třemi vodíkovými vazbami [40].

DGGE předchází amplifikace požadovaných úseků DNA pomocí PCR, při které jsou použity speciální primery s tzv. GC svorkami (Obr. 6). Tyto primery obsahují několik GC párů, které těžko denaturují a tím drží oddělené ssDNA, aby samotné ssDNA netvořily rozmazané proužky na gelu [40].



Obr. 6: Znárodnění GC-svorky a denaturace dvoušroubovice DNA. Převzato a upraveno z [41].

Tato metoda je schopná rozlišit specifické PCR produkty pouze do velikosti 500 bp, čímž ztěžuje fylogenetickou charakterizaci [40].

2.3.7 Sekvenování DNA

Sekvenování DNA je proces stanovení přesné sekvence nukleotidů v molekule DNA, tedy přesné pořadí adeninu, guaninu, tyminu a cytosinu. Znalost sekvencí DNA se stala nepostradatelnou pro výzkum aplikovaný v taxonomii, fylogenetice, forenzní biologii, biotechnologii, virologii i lékařské diagnostice či antropologii. Sekvenování DNA lze použít k učení pořadí jednotlivých genů, větších genetických regionů (shluků genů či operonu), chromozomů, nebo i celých genomů z jakéhokoliv organismu. Jedná se také o nejučinnější způsob, jak získat sekvenci RNA nebo proteinů [42].

V oboru fylogeneze jsou sekvenovány především části DNA, které kódují ribozomální RNA. Uplatnění našlo i v kriminalistice, kde jsou sekvenovány především opakující se sekvence DNA, tzv. mikrosatelity. Antropologie využívá srovnávání DNA ke zjišťování migrací lidských ras (zejména podle mitochondriální DNA a Y-chromozomální DNA). V zemědělství je DNA sekvenováno při tvorbě geneticky modifikovaných plodin (GMO) [42].

2.3.7.1 Sangerova metoda sekvenování DNA

Tato metoda byla vyvinuta Frederickem Sangerem roku 1977. Sangerova metoda neboli enzymová (dideoxy) metoda se používá k sekvenování jednovláknové DNA (ssDNA), jelikož využívá princip *in vitro* replikace DNA. Reakční směs obsahuje vhodný radioaktivně (^{32}P) nebo fluorescenčně značený primer, DNA polymerasu, deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP) a navíc také jeden ze čtyř 2',3'-dideoxynukleosidtrifosfátů (ddATP, ddGTP, ddCTP nebo ddTTP). Reakční směsi jsou tedy čtyři, každá s jiným dideoxynukleotidem. 5' → 3' replikace ssDNA probíhá až do okamžiku navázání dideoxynukleotidu na ssDNA, elongace druhého vlákna zde končí, jelikož neobsahuje OH skupinu na pozici 3' a další deoxynukleotid nemůže tvořit fosfodiesterovou vazbu [43].

Výsledné fragmenty dvouvláknové DNA (dsDNA) jsou rozděleny gelovou elektroforézou v závislosti na jejich velikosti. Gel může být vizualizován pomocí rentgenového záření a sekvence DNA tak může být přímo odečtena [43].

2.3.7.2 Pyrosekvenování DNA

Metoda byla vyvinuta Mostafou Ronaghim a Pål Nyrénem roku 1996. Pyrosekvenování DNA je stejně jako Sangerova metoda založena na syntéze druhého vlákna DNA podle templátu, ale k odečtení sekvence nepotřebuje gelovou elektroforézu, nýbrž detekuje uvolněný pyrofosfát po začlenění nukleotidu do sekvence. Přesněji je detekováno světlo pomocí bioluminiscence [44].

ssDNA je inkubována s enzymy DNA polymerasou I, ATP-sulfurylasou, luciferasou a apyrasou a se substráty adenosin-5'phosphosulfátem (APS) a luciferinem. Při zakorporování nukleotidu do DNA se uvolní pyrofosfát PP_i (rovnice 2), který ATP sulfurylasa přemění na ATP (rovnice 3). Následuje dvou kroková reakce, kde ATP a kyslík oxidují luciferin na oxyluciferin za katalýzy luciferasou, tímto se uvolní světlo, které je úměrné množství ATP (rovnice 4 a 5). Světlo je detekováno chemiluminiscencí a analyzováno v programu. Nezakorporované nukleotidy v DNA a ATP jsou degradovány apyrasou (rovnice 6), aby se mohl celý proces opakovat [44].

$(\text{DNA})_n + d\text{NTP} \rightarrow (\text{DNA})_{n+1} + \text{PP}_i$ (DNA polymerasa)	2
$\text{PP}_i + \text{APS} \rightarrow \text{ATP} + \text{SO}_4^{2-}$ (ATP sulfurylasa)	3
$\text{Luciferasa} + \text{D} - \text{luciferin} + \text{ATP}$ $\rightarrow \text{Luciferasa} - \text{luciferin} - \text{AMP} + \text{PP}_i$	4
$\text{Luciferasa} - \text{luciferin} - \text{AMP} + \text{PP}_i + \text{O}_2$ $\rightarrow \text{Luciferasa} + \text{oxyluciferin} + \text{AMP} + \text{CO}_2 + \text{světlo}$	5
$\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{AMP} + \text{P}_i$ (apyrasa)	6
$d\text{NTP} \rightarrow d\text{NDP} + d\text{NMP} + \text{P}_i$ (apyrasa)	

Existují dva typy pyrosekvenování DNA: pyrosekvenování v pevné fázi a pyrosekvenování v kapalní fázi, jelikož templátová DNA může být připravena dvěma způsoby, v pevné fázi se streptavidinem nebo v kapalně fázi enzymaticky. Nejprve je fragment DNA amplifikován pomocí PCR s biotinylovaným primerem, DNA je poté imobilizováno na magnetické kuličky s navázaným streptavidinem, který má vysokou afinitu k biotinu a nebiotinylované vlákno DNA je denaturováno NaOH [45].

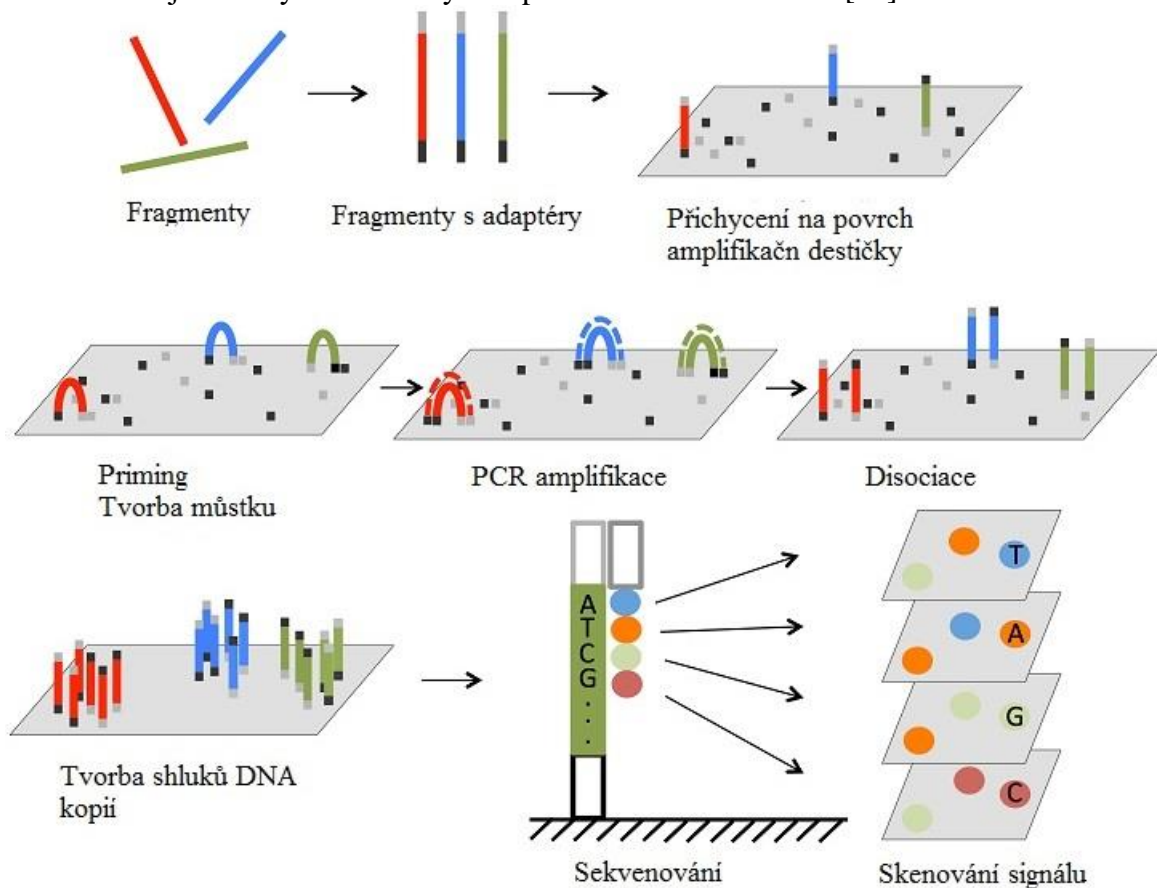
2.3.7.3 Sekvenování DNA nové generace

Hlavním cílem technologie sekvenování DNA je co nejrychlejší a nejlevnější proces získání sekvence DNA, jedná se tedy o neustále se vyvíjející technologii. Next-generation sekvenování

(NGS) je použito při sekvenování genomů a jeho resekvenování, při profilování transkriptomu (RNA sekvence), při zkoumání interakce DNA-protein a při charakterizaci epigenomu. Nové metody NGS jsou nástrojem k určení biologických a genetických mechanismů stárnutí, dlouhověkosti a nemocí souvisejících s věkem [46].

Metoda odvozená od pyrosekvenování je 454/Roche. DNA je amplifikováno uvnitř kapek vody v roztoku oleje (emulzní PCR), přičemž každá kapka obsahuje pouze jeden DNA templát. Sekvenační stroj obsahuje 1 600 000 jamek o objemech v řádu pikolitrů. Každá jamka obsahuje jednu streptavidinovou kuličku s templátovou DNA a sekvenační enzymy jako u pyrosekvenování a následuje stejný princip sekvenace [47].

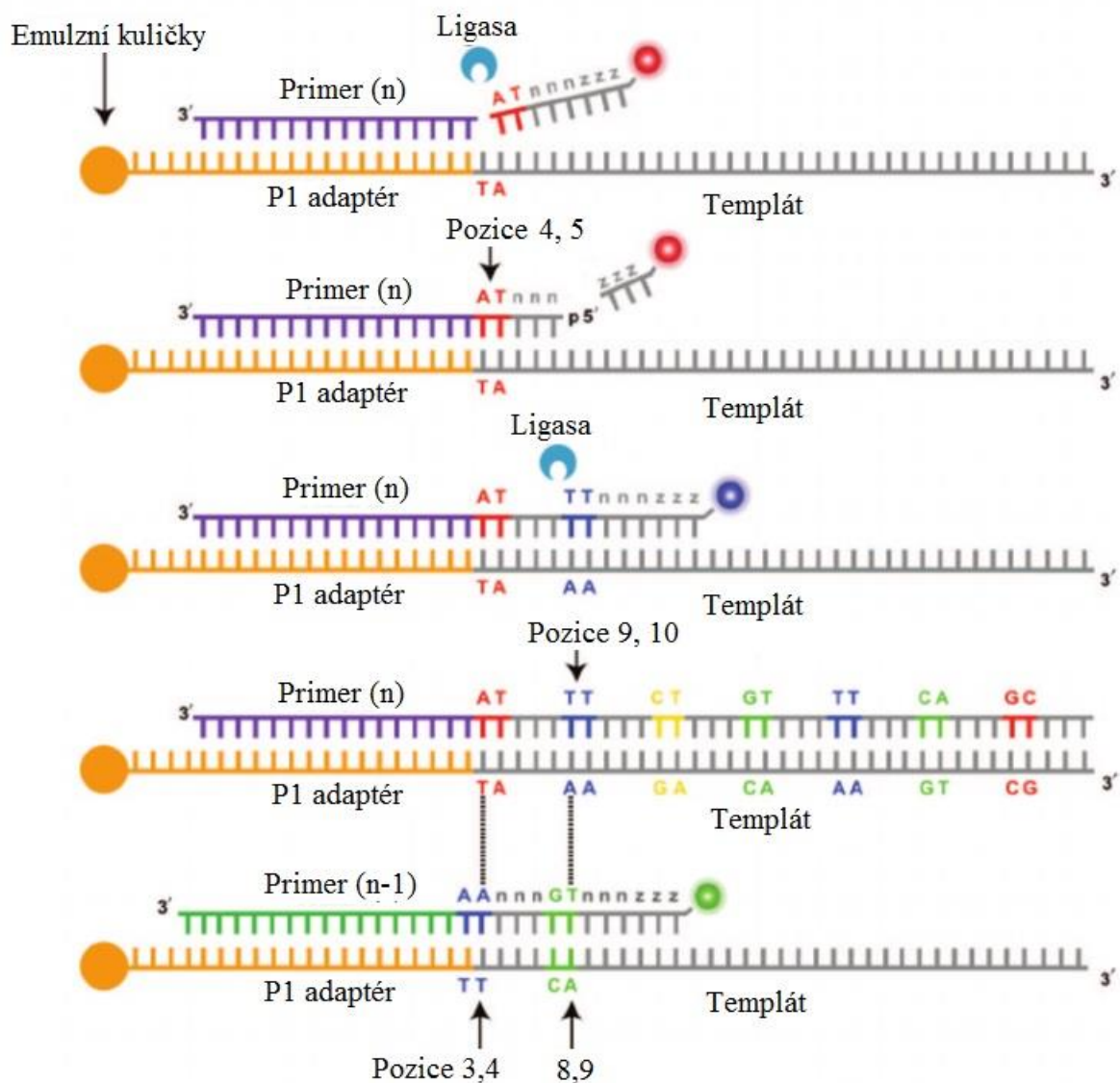
Illumina (Solexa) genomový analyzátor je založen na sekvenování syntézou druhého vlákna DNA. Náhodně fragmentovaná genomová DNA je ligována dvěma různými adaptéry na obou koncích, skrz které je ssDNA připevněno na povrch amplifikační destičky v průtokové cele a tvoří se tak „můstek“. ssDNA je amplifikováno pomocí PCR za vzniku shluků mnoha kopií fragmentů DNA. Na koncový adaptér je navázán primer, templáty DNA jsou poté sekvenovány pomocí čtyř odlišných fluorescenčně značených nukleotidů, a nakonec je detekována fluorescence odštěpené značky z reverzní terminační báze (RT-báze) CCD kamerou (Obr. 7). Touto metodou jsou obvykle odečteny 36 bp dlouhé sekvence DNA [48].



Obr. 7: Sekvenování DNA genomovým analyzátozem Illumina. Převzato a upraveno z [49].

Další NGS technologie je ABI SOLiD systém, pracující na principu ligace oligonukleotidů za katalýzy DNA ligasou (z anglického „Sequencing by Oligo Ligation and Detection“). Na fragmenty DNA jsou navázány adaptéry P1 a P2 dlouhé 25 bp. U této metody lze použít pro přípravu DNA i tzv. párové DNA neboli „mate-paired“ DNA knihovny, kde fragment DNA obsahuje adaptéry na svých koncích a také je adaptér začleněn do fragmentu DNA.

Amplifikace DNA probíhá podobně jako u metody 454/Roche emulzní PCR na mikrokuličkách. Poté jsou denaturovány templáty DNA a mikrokuličky jsou naneseny na skleněné podložky. V prvním kroku je primer hybridizován k adaptéru. Následně jsou hybridizovány i templáty DNA. Na DNA je ligován oligonukleotidový oktamer nesoucí jednu ze čtyř charakteristických fluorescenčních značek. Značené sondy jsou definovány prvními dvěma dNTP. Poté jsou enzymaticky odštěpeny trinukleotidy spolu se značkou a fluorescence je detekována a proces ligace se může opakovat. Po první detekci jsou sekvenovány nukleotidy v pozici 4 a 5, po druhé ligaci jsou sekvenovány nukleotidy v pozici 9 a 10 atd. Sekvence probíhá po celé délce templátu DNA, což je v tomto případě kolem 35 bp. Poté pokračuje sekvenace stejným způsobem, ale s primerem kratším o jeden nukleotid, takže jsou sekvenovány nukleotidy v pozici 3 a 4, 8 a 9 atd. Každý nukleotid je přečten dvakrát, jedná se o dvoubázové dekódování, čímž se snižuje chybovost ve čtení sekvencí DNA (Obr. 8) [50].



Obr. 8: Princip ABI SOLiD sekvenování. Převzato a upraveno z [51].

2.3.7.4 Sekvenování DNA třetí generace

Třetí generací sekvenace DNA je myšleno přímé sekvenování malého množství DNA, tyto techniky dokáží detekovat jediný foton, tedy DNA bez předchozí amplifikace. PCR amplifikace může způsobit chyby v sekvenci nukleotidů zkopírované DNA nebo upřednostňují jiné sekvence, čímž mění relativní četnost a hojnost různých fragmentů DNA, které existovaly před amplifikací [50].

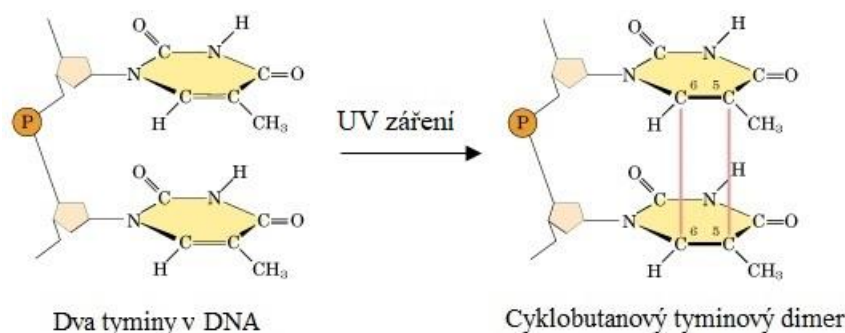
Firma Helicos Biosciences představila v roce 2007 první komerční systém schopný sekvenovat jedinou molekulu DNA s názvem HeliScope. Fragmenty nukleové kyseliny 100-200 bp hybridizují na primery kovalentně zakotvených v náhodných polohách na skleněné destičce v průtokové cele. Primer je oligo(dT)50, je tedy nezbytné připravit fragmenty DNA s poly(A) 3'koncem. Reakční směs obsahuje primer, DNA polymerázu a značené nukleotidy. Souřadnice zachycených řetězců na destičce jsou zaznamenány CCD kamerou a před dalším sekvenováním je fluorescenční značení odstraněno a odplaveno [50].

2.4 Náhodná mutagenese

Mutagenesí mikrobiální DNA lze dosáhnout lepší produkce metabolitů, v našem případě karotenoidů a lipidů. Rozeznáváme mutace samovolné a indukované. Indukované mutagenese lze dosáhnout působením mutagenů, mezi něž patří například *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (NTG), methylester kyseliny methansulfonové (MMS), ethylester kyseliny methansulfonové (EMS), ethylenoxid (EO; oxiran), diepoxybutan (DEB; bioxiran), antimycin, ethyl-methansulfonát, UV záření, γ -záření nebo vysoký hydrostatický tlak [11] [52]. V závislosti na rozsahu mutace dělíme na genovou neboli bodovou mutaci, chromozomovou či genomovou mutaci. Z biotechnologického hlediska jsou nejdůležitější bodové mutace, především tranzice a transverze, jelikož tyto mutace způsobují změnu pouze jediné aminokyseliny v bílkovině přeložené z mRNA a tato bílkovina má zachovanou původní vlastnost. Typem genových mutací jsou také inserce a delece, jedná se o přidání či odebrání jedné báze z řetězce DNA. Tento typ mutací je v biotechnologiích nežádoucí, jelikož má velký dopad na původní funkci bílkovin a to, že podle mRNA se syntetizuje úplně jiná bílkovina z důvodu rozdílné sekvence kodonů. Inzerci způsobují interkalační činidla, např. akridinová barviva a mají vysokou účinnost na mitochondriální DNA kvasinek [52].

2.4.1 Fyzikální mutagenese

Hojně používaným mutagenem je UV záření o vlnové délce 265 nm, jelikož zde DNA vykazuje nejvyšší absorpci. Mutace je způsobena tvorbou kovalentní vazby mezi dvěma pyrimidiny, převážně thyminy a tvoří se pyrimidinové dimery (Obr. 9). Dalším fyzikální mutagenem je ionizující záření, mezi které patří rentgenové paprsky, γ -záření či α -částice, která excituje elektrony, jež se odštěpují z atomů, vznikají vysoce reaktivní ionty, ty mohou způsobit poškození molekul DNA buď narušením vodíkových vazeb mezi párovými dusíkatými bázemi, nebo štěpí fosfodiesterovou vazbu v DNA. Ionizující záření způsobuje poškození DNA většího rozsahu v úseku několika genů [52].



Obr. 9: Tvorba pyrimidinových dimerů způsobené UV zářením. Převzato a upraveno z [53].

2.4.2 Chemická mutagenese

Některé chemické mutageny se hojně používají pro průmyslové a vědecké účely k získání mikrobiálních mutantů. Alkylační činidla MMS či EMS způsobují genové mutace nazývané tranzice nebo transverze. Tranzice je záměna purinových bází mezi sebou ($A \leftrightarrow G$) a pyrimidinových bází mezi sebou ($C \leftrightarrow T$). Transverze je výměna purinové za pyrimidinovou bázi a naopak. MMS a EMS alkylují guanin za vzniku O^6 -alkylguaninu, což způsobí při replikaci DNA navázání tyminu místo cytosinu. Tranzice způsobují činidla obsahující purin či pyrimidin anebo také hydroxylamin, který působí na cytosin a mění C-G na T-A [52].

2.4.3 Reparace DNA

DNA v buňkách podléhá kontinuálnímu poškozování. Reparace DNA je mechanismus oprav poškozené DNA, avšak některé systémy nefungují přesně, a proto vedou ke vzniku mutací. Mezi opravné mechanismy kvasinek patří fotoreparace a reparace bez účasti viditelného světla [52].

Fotoreparace vyžaduje silné viditelné světlo k získání energie a fotoreaktivní enzym fotolyasa k přerušení vazeb cyklobutanového kruhu pyrimidinového dimeru způsobené UV zářením. DNA je obnoveno do původního stavu [54].

Reparace chybné DNA způsobené alkylačními činidly je provedena enzymem O^6 -methylguanin methyltransferasou, která přenáší methylovou skupinu z O^6 -methylguaninu na cysteinový zbytek v aktivním místě enzymu. Je obnoven původní guanin a potenciální chemická mutagenese je potlačena [54].

2.4.3.1 Excizní opravy

Dalším typem oprav DNA jsou excizní opravy, které napravují mutace způsobené chemickým poškozením, vystřihnutím nukleotidu či oligonukleotidu z dsDNA. Opravné enzymové systémy kontrolují dvoušroubovici DNA a identifikují nesprávně spárované báze. Poškozené DNA je rozpoznáno a chybný úsek je odstraněn buď jako volná báze nebo jako nukleotid. Vzniklá mezera je pak vyplněna syntézou nového vlákna DNA, za použití nepoškozeného komplementárního řetězce jako templátu. Excizní opravy se dělí na tři typy: báze-excize, nukleotid-excize a mismatch oprava [54].

Excize DNA obsahující uracil je oprava typu báze-excize, kde jsou jednotlivé poškozené báze rozpoznány a odstraněny z molekuly DNA. Uracil může vzniknout v DNA dvěma mechanismy. Za prvé je uracil jako dUTP (deoxyuridin trifosfát) začleněn místo thyminu během syntézy DNA a za druhé se uracil tvoří v DNA deaminací cytosinu. Enzym DNA glykosylasa vyřízne chybný úsek a vytvoří AP místo. AP (apurinic/apyrimidinic) endonukleasa

rozštěpí poškozený řetězec, endonukleasa odstraní několik residuí okolo a mezera je vyplněna pomocí DNA polymerasy a DNA ligasy [54] [55].

Pyrimidinové dimery lze opravit i jejich vyříznutím z vlákna DNA spolu s okolními nukleotidy. Tento typ reparace se nazývá nukleotid-excize. Vzniklá mezera je pak vyplněna pomocí DNA polymerasy a zacelela ligasou [54].

Mismatch oprava následuje po ukončení replikace DNA a kontroluje správnost párování po DNA polymerase. Rozpozná nově syntetizované vlákno od rodičovského vlákna, jelikož ještě nebylo methylované. Protein MutS (Mutator S) se váže na nesprávnou bázi, následuje vazba MutL. Vazba MutL aktivuje Muth, která štěpí nejbližší bázi na opačném místě methylace. MutS a MutL společně s helikasou a exonukleasou odštěpí oligonukleotid z dvoušroubovice obsahující chybnou bázi. Mezera je dosyntetizována DNA polymerasou a utěsněna ligasou [54].

2.5 Odpadní substráty

Odpadních substrátů v biotechnologickém průmyslu se používá hlavně k získání cílených produktů s co nejvyšším výtěžkem za nejvýhodnější cenu. Odpadní substráty kromě základního zdroje uhlíku mohou obsahovat jiné živiny, například proteiny jako zdroj dusíku či soli. Mezi hojně používané odpadní substráty v biotechnologickém průmyslu patří syrovátka z mlékárenství, fritovací oleje, odpady z ovoce, zeleniny, cukrové třtiny či obilí.

2.5.1 Odpadní syrovátka

Syrovátka je významným odpadním sacharidovým substrátem. Vzniká jako odpadní produkt při výrobě mléčných výrobků a roční produkce je odhadována na 145 milionů tun, z toho 85 milionů tun je využito v průmyslu a zpracováno na produkty s přidanou hodnotou. Zbylých 60 milionů tun se používá jako kapalné krmivo pro zvířata či hnojivo a odpad. Syrovátka tvoří 80–90% mléka použitého pro výrobu a obsahuje 4,5 % (w/v) laktózy, 0,8 % (w/v) proteinů, 1 % (w/v) solí, 0,1–0,8 % (w/v) kyseliny mléčné a 0,6 % popelu. Nevýhodou tohoto substrátu je nízká rozpustnost laktózy (210 g/l) ve srovnání s glukózou (700 g/l) [56]. Hlavními proteiny v syrovátce jsou β -laktoglobulin (β -lg, 65 %), α -laktalbumin (α -la, 25 %) a sérový albumin (8 %) a v menší míře obsahuje i glykomakropeptid (GMP) a proteiny BSA, laktoferrin, imunoglobulin, fosfolipoprotein a laktoperoxidasu. Tyto proteiny jsou bohaté na esenciální aminokyseliny lysin, methionin a cystein a mají antimikrobiální, antivirální a antioxidační aktivitu [57]. Syrovátka má zastoupení i v léčbě rakoviny či HIV [58].

Existují dva typy syrovátky, syřidlem indukovaná koagulace kaseinu nastává při pH 6,5 a jedná se o sladkou syrovátku. Kyselá syrovátka má pH < 5 a vzniká z fermentačních procesů nebo přidáním organických či minerálních kyselin pro koagulaci kaseinu [58].

V článku Márová *et al.* (2012) získali několikanásobné zvýšení výnosu β -karotenu produkovaného kvasinkou *Sporobolomyces roseus* kultivované na nezpracované syrovátce (2,52 mg β -karotenu na 1 g biomasy) i deproteinované syrovátce (2,78 mg β -karotenu na 1 g biomasy) přidané do produkčního média oproti kontrole (65,6 μ g β -karotenu na 1 g biomasy) [14].

2.5.2 Škrob

Odpadní škrob z průmyslového zpracování brambor způsobuje vážné problémy životního prostředí. Továrna na bramborový škrob s produkcí 10 000 tun škrobu ročně vypustí 720 tun odpadních vod a 192 tun bramborových zbytků za den po dobu 100 dní v roce [59].

Škrob je zásobní rostlinný polysacharid složený ze dvou polysacharidů, rozpustného amylopektinu (80 %) a amylozy (20 %). Oba polysacharidy jsou složeny z glukózových jednotek spojených α -1,4-glykosidickými vazbami a amylopektin se ještě větví α -1,6-glykosidickými vazbami. Lze jej využít jako substrát v biotechnologickém průmyslu k výrobě krmiv pro zvířata s vysokým obsahem lysinu [59], bioethanolu [60], biovodíku [61], mléčné kyseliny, poly(3-hydroxybutyrátu) [62] aj.

Jestliže má být substrátem škrob pro cílenou produkci, ať už bramborový, kukuřičný, pšeničný, rýžový či jiný, je potřeba, aby jej kvasinky dokázaly hydrolyzovat, a to s pomocí amylas. Existují tři skupiny těchto enzymů – α -amylasa, β -amylasa a glukoamylasa. α -amylasa (α -1,4-D-glukan-glukanohydrolasa, EC 3.2.1.1) je endoamylasa, metaloenzym obsahující vápník, hydrolyzující polysacharidy s α glykosidickými vazbami, tedy škrob i glykogen. Podle stupně degradace dělíme α -amylasu na sacharizující, která štěpí 50–60 % glykosidických vazeb a zkapaňující, která štěpí 30–40 % glykosidických vazeb. Její činností vzniká maltóza, maltotrióza a jiné oligosacharidy. β -amylasa (α -1,4-D-glukanmaltohydrolasa, EC 3.2.1.2.) je exoamylasa, štěpí α -1,4 vazbu za vzniku disacharidů maltózy a β -dextrinu. Další exoamylasa je glukoamylasa (α -1,4-D-glukanhydrolasa, EC 3.2.1.3.), která je schopná štěpit α -1,4 i α -1,6 vazby a jejím působením vzniká α -D-glukóza [63].

2.5.3 Odpadní glycerol

Glycerol (také známý jako glycerin) je hlavní vedlejší produkt při výrobě bionafty. Obecně platí, že na každých 45 kg bionafty vznikne přibližně 4,5 kg surového glycerolu. Vzhledem k tomu, že průmysl bionafty se rychle rozvíjí, vzniká nadbytek surového glycerolu. U velkých výrobců bionafty může být surový glycerol modifikován do čisté formy a pak použit v potravinářství, farmacii nebo kosmetice. Čištění glycerolu je drahé a menší výrobci bionafty musí hledat alternativní metody pro jeho likvidaci. Mezi metody odstranění a využití tohoto surového glycerolu patří spalování, kompostování, anaerobní digesce, krmiva pro zvířata, a termochemické/biologické konverze na produkty s přidanou hodnotou. Tepelnou úpravou lze glycerol převést na propylenglykol, acetol aj. Glycerol také slouží jako vstupní surovina v různých fermentačních procesech [64].

Methanol a volné mastné kyseliny (mýdla) jsou hlavní nečistoty obsažené v surovém glycerolu. Existence methanolu je zde vzhledem k tomu, že výrobci bionafty používají přebytek methanolu k chemické transesterifikaci. Mýdla, která jsou rozpustná v glycerolu, pochází z reakce mezi volnými mastnými kyselinami přítomných v počáteční vstupní surovině a katalyzátoru (báze). Surový odpadní glycerol také obsahuje vápník, hořčík, fosfor a síru, jejich množství jsou v závislosti na zdroji vstupní suroviny (řepka, sója aj.) [64].

Surový glycerol odvozený z alkalicky katalyzované transesterifikace má obvykle tmavě hnědou barvu s vysokým pH (11–12). Při úpravě pH na neutrální hodnotu kyselinou chlorovodíkovou, vznikne z mýdla volná mastná kyselina, která způsobuje zákal. Po čase se roztok rozdělí na dvě čiré fáze, glycerol je spodní fází [64].

2.5.4 Výroba bionafty

Jedná se o methyl a ethyl estery mastných kyselin (FAME a FAEE). Bionafta, též biodiesel, je ekologické palivo pro vznětové motory (diesely). Vyrábí se z rostlinných olejů transesterifikací, nejčastěji ze sójového, slunečnicového, palmového či řepného, za katalýzy silnými kyselinami či zásadami. V dnešní době musí výrobci povinně přimíchat 5 % bionafty do nafty vyrobené z ropy.

Potenciál v produkci bionafty lze nalézt u biologické konverze pomocí oleogenních mikroorganismů, které jsou definovány jako mikroby s obsahem látek lipidické povahy vyšším než 20 % jejich suché hmotnosti. Tyto organismy a jejich lipidy jsou označovány zkratkou SCO (single cell oils). Mnohé oleogenní kvasinky jsou schopné akumulovat triacylglyceroly nad 40 % obsahu sušiny. Složení těchto TAG je velmi podobné rostlinným TAG. Thliveros *et al.* (2014) představili novou metodu výroby bionafty, která je vybavená systémem přímé methanolýzy buněčné biomasy kvasinky *Rhodospiridium toruloides* Y4. Reakce je katalyzována bazicky NaOH. Zkoumali vliv koncentrace katalyzátoru a methanolu, reakční teplotu a dobu a obsah vlhkosti na úroveň esterifikace. Bylo zjištěno, že nejvhodnější podmínky kultivace jsou 4 g/l NaOH, 1:20 (w/v) poměr methanolu k sušině, po dobu 10 h při teplotě 50°C za okolního tlaku. Za těchto podmínek je výtěžek methylesterů mastných kyselin 97,7 %. Nový způsob přímé bazicky katalyzované methanolýzy za účelem produkce bionafty je mnohem jednodušší, méně pracný, méně časově náročný a s vyšším výtěžkem než konvenční procesy [65].

3 CÍLE

Cílem předložené práce bylo v první fázi vypracování aktuální rešerše zaměřené na identifikaci karotenogenních kvasinek a produkci metabolitů. Dalším cílem bylo studium produkce lipidů a karotenoidů vybraných kmenů karotenogenních kvasinek, jejich molekulární charakterizace, kultivace na zvolených substrátech včetně odpadních substrátů a náhodná mutageneze za cílem zlepšení jejich produkčních vlastností a molekulární charakterizace. V rámci optimalizace mutageneze byla cílem selekce stabilních mutantů, ověření nadprodukčních vlastností, molekulární a metabolická charakterizace nejlepších produkčních mutantních kmenů ve srovnání s původními kmeny.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 „Drop“ test a kultivace kvasinek

Kvasničný autolyzát (Himedia; Indie)
D-glukóza monohydrát (Penta; ČR)
Pepton (Himedia; Indie)
Síran sodný (Lach-Ner; ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner; ČR)
Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner; ČR)
Agar type I (Himedia; Indie)
Bramborový škrob (Lach-Ner; ČR)
Odpadní syrovátka (Savencia; ČR)
Laktosa monohydrát (Lach-Ner; ČR)
Glycerol (Lach-Ner; ČR)
D-mannosa (Sigma-Aldrich; Německo)
D-xylosa (Serva; Německo)
Yeast Nitrogen base without Amino Acids (Sigma-Aldrich; Německo)

4.1.2 Stanovení redukujících cukrů – Somogyi-Nelson

Uhličitan sodný (Lach-Ner; ČR)
Hydrogenuhlíčan sodný (Penta; ČR)
Tetrahydrát vlnanu sodno-draselného (Lach-Ner; ČR)
Pentahydrát síranu měďnatého (Lach-Ner; ČR)
Molybdenan amonný (Lach-Ner; ČR)
Kyselina sírová (Penta; ČR)
Heptahydráthydrát hydrogenarseničnanu sodného (Sigma-Aldrich; Německo)

4.1.3 Izolace DNA a analýza DNA

Triton X-10 (Sigma-Aldrich; Německo)
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
Skleněné kuličky
Fenol-chloroform-isoamylalkohol (Sigma-Aldrich; Německo)
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; Velká Británie)
Syntetické primery NL1, NL4, LS2, ITS1, ITS4, ITS2, ITS3 (Elisabeth Pharmacon; ČR)
DNA Ladder (Nipon Genetics; Německo)
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)

4.1.4 Gelová elektroforéza

Kyselina octová (Lach-Ner; ČR)
Agarosa (Thermo Fischer scientific; USA)
Ethidium bromid (Serva; Německo)
Bromfenolová modrá – sodná sůl (Serva; Německo)
DNA marker (Top-Bio; ČR)
MiliQ voda pro PCR

4.1.5 DGGE

Akrylamid (Serva; Německo)
N,N'-methylenbisakrylamid (Serva; Německo)
Formamid (Sigma-Aldrich; Německo)
Močovina (Penta; ČR)
TAE pufr

4.2 Použité vybavení

Centrifuga vysokorychlostní chlazená (Hermle; Německo)
Centrifuga chlazená (Eppendorf; Německo)
Elektroforetická komora (Bio-rad; USA)
ELISA Reader (BioTek; USA)
Filtry pro HPLC, PRE-CUT, (Alltech; Velká Británie)
Fluorescenční mikroskop pro biotechnologii (Labomed; USA)
Inkubátor INCU-Line (VWR Collection; USA)
Laminární box (Esco; Singapur)
Mikrocentrifuga (Labnet international; USA)
Opticko mechanický adaptér (Canon; Japonsko)
PCR cykler (Bio-rad; USA)
Průtokový cytometr (Apogee flow systems; Velká Británie)
Sušárna (Memert; Německo)
UV/VIS spektrofotometr (Boeco; Německo)
UV transiluminátor (Major Science; USA)
Vakuová odparka RV 06 (IKA; Německo)
Zdroj napětí (Major Science; USA)

4.2.1 RP-HPLC/PDA

Soustava HPLC/MS (Thermo Fischer scientific; USA)
Termostat – LCO 10, Column Oven (ECOM; ČR)
Detektor PDA – PDA Plus Detector (Thermo Fischer scientific; USA)
Pumpa – MS Pump Plus (Thermo Fischer scientific; USA)
Vyhodnocovací systém Xcalibur

Kolona Kinetex C18, 5 mm, 4,6 x 150 mm (Phenomenex; USA)

Držák předkolony – KJ0 - 4282, (ECOM; ČR)

Předkolona – C18, AJ0 – 4287 (Phenomenex; USA)

4.3 Použité druhy kvasinek

Druhy kvasinek v této práci byly vybrány podle jejich fyziologické podobnosti a taxonomického zařazení (Tab. 1: Použité druhy karotenogenních kvasinek).

Tab. 1: Použité druhy karotenogenních kvasinek a jejich sbírkové číslo CCY (Culture Collection of Yeasts).

Označení	Druh	Sbírkové číslo
2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	CCY 20-2-33
3	<i>Rhodotorula glutinis</i>	CCY 20-2-26
10	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	CCY 19-4-6
11	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	CCY 19-20-3
12	<i>Sporobolomyces roseus</i>	CCY 19-6-4
18	<i>Rhodotorula toruloides</i>	CCY 20-7-28
19	<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	CCY 19-9-6
20	<i>Sporobolomyces metaroseus</i>	CCY 19-6-20

Číselným označením karotenogenních kvasinek 2, 3, 10, 11, 12, 18, 19 a 20 budou dané druhy kvasinek značeny v praktické části dokumentu.

4.4 Použité metody

4.4.1 Molekulární metody

4.4.1.1 Izolace DNA

Nejprve byl připraven lyzační pufr podle

Tab. 2: Chemikálie pro přípravu lyzačního pufu. Do zkumavek typu Eppendorf obsahující 300 µl lyzačního pufu a asi 0,3 g skleněných kuliček byly přidány kvasinky z agarové plotny. Do pufu bylo přidáno 300 µl fenol-isoamylalkoholu. Mikrozkušavky byly vortexovány 10 minut a poté centrifugovány 5 minut při 13 000 rpm. Vrchní fáze byla odebrána a bylo k ní přidáno 500 µl vychlazeného 100% ethanolu (pro UV-VIS). Vzorke byly ponechány na 20 min v -20°C a poté byly centrifugovány 10 min při 13 000 rpm. Ethanol byl odstraněn a k DNA bylo přidáno 500 µl vychlazeného 70% ethanolu a poté byly vzorky opět centrifugovány 10 min při 13 000 rpm. Ethanol byl opatrně odsán a DNA se nechalo schnout v mikrozkušavkách s otevřeným víčkem při 37°C. Vysušená peleta byla rozpuštěna ve 200 µl mili-Q vody.

Tab. 2: Chemikálie pro přípravu lyzačního pufru.

Výsledná koncentrace chemikálie
2% Triton X-10
1% dodecylsírán sodný (SDS)
100 Mm NaCl
10 Mm Tris-HCl (pH 8)

4.4.1.2 „Nested“ PCR oblastí ITS1, ITS2 a D1/D2 velké ribozomální podjednotky

Optimalizace PCR dlouhé oblasti kvasinkové rDNA byla amplifikována pomocí primerů ITS1 a NL4 a za použití čtyř různých kitů: Top-Bio [66], KAPA2G Robust [67], KAPA Long Range [68] a BioLabs [69]. Pro amplifikaci oblastí ITS1 byly použity primery ITS1-GC a ITS2, pro amplifikaci oblastí 5,8S-ITS2 primery ITS3 a ITS4-GC a pro amplifikace D1/D2 oblastí primery NL1 a LS2 (Tab. 7). Pro amplifikaci krátkých úseků DNA byly použity kity KAPA2G Robust [67], KAPA Long Range [68] a BioLabs [69].

Master Mix značky Top-Bio se dodává 2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerasy, monoklonální protilátka anti-Taq (38 nM), barvivo, stabilizátory a aditiva [66]. Reakční směs o objemu 25 μl byla připravena smísením 12,5 μl Master Mixu, 9,5 μl H₂O pro PCR, 1 μl forward primeru 10x ředěného, 1 μl reverse primeru 10x ředěného a 1 μl templátové DNA. Reakční směs v 0,2 ml zkumavkách byla promíchána, zvortexována a umístěna do PCR termocykleru. Program PCR termocykleru byl nastaven podle Tab. 3.

Tab. 3: Podmínky programu PCR pro kit Top-Bio.

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94; 95°C	2; 5; 10 min	1
Denaturace	94; 95°C	15; 30 s	
Nasednutí primeru	56°C	15; 30 s	30; 35
Elongace	72°C	30 s; 1; 2 min	
Finální extenze	72°C	2; 5 min	1
Chlazení	4°C	5 min	1

Reakční směs kitu KAPA2G Robust o objemu 25 μl byla připravena smísením 5 μl 5X KAPA2G pufru A obsahujícího 1,5 mM MgCl₂, 0,5 μl 10 mM dNTP, 1,25 μl forward primeru 10x ředěného, 1,25 μl reverse primeru 10x ředěného, 1 μl templátové DNA a 0,1 μl a 0,2 μl 5 U/μl KAPA2G Robust DNA polymerasy, jejíž finální koncentrace byla 0,5 U a 1 U. Reakční směs byla doplněna do 25 μl sterilní PCR vodou a v 0,2 ml zkumavkách byla promíchána, zvortexována a umístěna do PCR cykléru. Program PCR termocykleru byla nastaven podle Tab. 4.

Tab. 4: Podmínky programu PCR cykléru pro kit KAPA 2G Robust.

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	95; 96°C	5; 10 min	1
Denaturace	95; 98°C	15; 30 s	
Nasednutí primeru	56; 58; 60°C	15; 30 s	30; 35
Elongace	72°C	30 s a 1; 2 min	
Finální extenze	72°C	2 min	1
Chlazení	4°C	5 min	1

Reakční směs kitu KAPA Long range o objemu 25 μ l byla připravena smísením 5 μ l 5X KAPPA LR pufru bez Mg^{2+} , 1,75 μ l 0,25 mM $MgCl_2$, 0,75 μ l 10 mM dNTP, 1,25 μ l forward primeru 10x ředěného, 1,25 μ l reverse primeru 10x ředěného, 1 μ l templátové DNA a 0,1 μ l 5 U/ μ l KAPA LongRange DNA polymerasy. Reakční směs byla doplněna do 25 μ l sterilní PCR vodou a v 0,2 ml zkumavkách byla promíchána, zvortexována a umístěna do PCR termocykleru. Program PCR termocykleru byla nastaven podle Tab. 5.

Tab. 5: Podmínky programu PCR pro kit KAPA Long range.

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94°C	2 min	1
Denaturace	94°C	15 s	
Nasednutí primeru	56; 58; 60°C	15 s	30
Elongace	72°C	30 s a 1; 2 min	
Finální extenze	72°C	5 min	1
Chlazení	4°C	5 min	1

Reakční směs kitu New England BioLabs o objemu 25 μ l byla připravena smísením 5 μ l 5X Q5 reakčního pufru, 5 μ l 5X Q5 High GC enhanceru, 0,5 μ l 10 mM dNTP, 1,25 μ l forward primeru 10x ředěného, 1,25 μ l reverse primeru 10x ředěného, 1 μ l templátové DNA a 0,1 μ l Q5 High-Fidelity DNA polymerasy. Reakční směs byla doplněna do 25 μ l sterilní PCR vodou a v 0,2 ml zkumavkách byla promíchána, zvortexována a umístěna do PCR termocykleru. Program PCR termocykleru byla nastaven podle Tab. 6.

Tab. 6: Podmínky programu PCR pro kit New England BioLabs.

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	98°C	30 s	1
Denaturace	98°C	10 s	
Nasednutí primeru	56°C	30 s	30
Elongace	72°C	45 s; 1,5 min	
Finální extenze	72°C	5 min	1
Chlazení	4°C	5 min	1

Tab. 7: Primery použité pro jednotlivé amplifikační kroky „nested“ PCR a jejich sekvence.

Vnější primery	Oblast ITS1-5,8S-ITS2 a D1/D2	
	Primer	Sekvence
	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
Vnitřní primery	Oblast ITS1	
	Primer	Sekvence
	ITS1-GC	5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGG TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
	Oblast 5,8S-ITS2	
	Primer	Sekvence
	ITS3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'
	ITS4-GC	5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGG TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
	Oblast D1/D2	
	Primer	Sekvence
	NL1	5'-GCCATATCAATAAG-3'
LS2	5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'	

4.4.1.3 Ethanolová precipitace PCR produktů

Templátová DNA byla přečištěna pomocí lineárního polyakrylamidu Carrier-ACRYL. Ke 25 µl DNA byl přidán 1 µl Carrier-ACRYLU, 2,5 µl 3M roztoku octanu sodného o pH 5,2 a 75 µl 96% EtOH, směs byla promíchána a ponechána po dobu nejméně 30 min v mrazáku při -20°C. Směs byla centrifugována při 14 000 rpm po dobu 15 min při 4°C. Supernatant byl opatrně odstraněn a k peletě bylo přidáno 200 µl 75% EtOH a následovalo centrifugování při 14 000 rpm po dobu 2 min při 4°C. Supernatant byl opatrně odstraněn, peleta byla vysušena a rozpuštěna ve 25 µl 10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA pufru [70].

4.4.1.4 Gelová elektroforéza DNA

Byl připraven zásobní pufr TAE 50krát koncentrovaný podle Tab. 8. Byl připraven agarosový gel rozpuštěním 1,8 g/l agarosy v 1x TAE pufru spolu s cca 200 µl ethidium bromidu. Gel byl nalit do horizontální elektroforetické cely a do gelu byl umístěn hřeben. Po zatuhnutí gelu bylo do jamek nanášeno 14 µl kvasinkové DNA spolu s 6 µl barvicího pufru (0,5 ml 2% bromfenolové modře a 7 ml glycerolu na 10 ml demineralizované vody) a 5 µl ladderu (200-1 500 bp). Separace PCR produktů probíhala po dobu 1 hod při 110 V a 400 mA.

Tab. 8: Složení v 1 l 50krát koncentrovaného TAE pufru.

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

4.4.1.5 DGGE

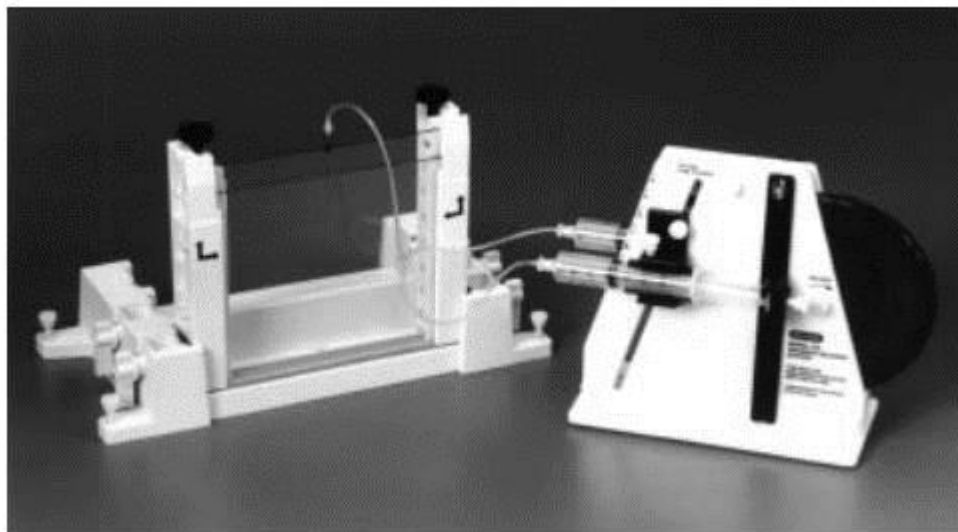
Po vizualizaci úspěšné amplifikace krátkých úseků DNA na gelové elektroforéze byly vzorky dále analyzovány metodou DGGE.

Bylo připraveno 200 ml zásobního 40% roztoku AA/Bis, složeného ze 76 g akrylamidu a 4 g *N,N'*-metylen-bis(akrylamidu). Ze zásobního 40% roztoku byly připraveny 8% roztoky AA/Bis v 1krát TAE pufru s 30 %, 50 %, 60 %, 70 % a 80 % denaturačních činidel. Denaturační řada byla připravena podle Tab. 9.

Tab. 9: Složení denaturační řady pro DGGE v 8% roztoku AA/Bis.

Denaturační činidlo	30 %	50 %	60 %	70 %	80 %
Formamid (ml)	12	20	24	28	32
Močovina (g)	12,6	21,0	25,2	29,4	33,6

Byla připravena aparatura pro přípravu akrylamidového gelu (Obr. 10). Jako stop gel bylo použito 5 ml 8% AA/Bis roztoku, po ztuhnutí gelu bylo mezi skla dávkováno 10 ml gelu s dvěma rozdílnými koncentracemi denaturačních činidel v závislosti na typu PCR produktů a jejich T_m . Pro ITS1 oblasti kvasinkové DNA byl použit denaturační gradient 60–80 %, pro ITS2 50 – 70 % a pro D1/D2 30 – 50% a 50 – 80 %. Nakonec byla vrchní část gelu zalita 8% akrylamidovým gelem bez denaturačních činidel, do něhož byl umístěn hřebínek pro vytvoření jamek v gelu. Gely byly nanášeny pomocí plnicích stříkaček a jehly a na nanesení gelu s denaturačními činidly bylo použito míchací zařízení pro tvorbu denaturujícího gradientu. Polymerace AA/Bis roztoku byla iniciována za použití 40 μ l persulfátu amonného připraveného rozpuštěním 0,1 g APS v 1 ml deionizované vody a 8 μ l TEMEDu (*N,N'*-tetramethylendiamin).



Obr. 10: Zařízení pro nanášení AA/Bis gelu s denaturačním gradientem.

Připravený gel byl umístěn do elektroforetické vany obsahující 7 litrů 1x TAE pufru. Po vyhřátí elektroforetického pufru i gelu na 60°C bylo nanášeno 10 μ l PCR produktů smíšených s 5 μ l bromfenolové modři (0,5 ml 2% bromfenolové modři a 7 ml glycerolu na 10 ml demineralizované vody). Po nanesení vzorků následovala samotná separace jednotlivých PCR produktů v denaturačním gradientu DGGE. Elektroforetická komora byla napojena na zdroj proudu 140 mA a napětí 100 V a separace PCR produktů probíhala po dobu 12 hodin při 60°C. Po proběhnutí denaturační gradientové gelové elektroforézy byl

polyakrylamidový gel přemístěn z formy do barvicí lázně obsahující 250 ml 1xTAE pufru a 50 μ l ethidiumbromidu o koncentraci 10 mg/ml na dobu 20 minut. Gel byl vizualizován pod UV zářením.

4.4.1.6 Sekvence oblasti ITS1-5,8S-ITS2 a D1/D2

Samotné sekvenaci dlouhé oblasti ribozomální DNA předcházela izolace DNA vybraných karotenogenních kvasinek, amplifikace dlouhé oblasti rDNA a její ethanolové přečištění. Následně byla změřena koncentrace amplifikované DNA a provedena elektroforéza. K DNA vzorkům bylo přidáno 25 pmol primeru ITS1.

Sekvence na zakázku zajišťuje firma SEQme s.r.o. [71]. Získané výsledky byly zpracovány ve formátu FASTA a následně byly vyhodnoceny pomocí algoritmu služby BLAST databáze National Center for Biotechnology Information (NCBI) [72].

4.4.2 Kultivační metody

4.4.2.1 „Drop“ test

Jako první byla nutná příprava sterilního materiálu a inokulačních médií pro kvasinky. Byly vysterilovány zkumavky obsahující 5 ml YPD média připraveného rozpuštěním 10 g/l kvasničného autolyzátu, 20 g/l peptonu a 20 g/l D-glukózy v destilované vodě. Do sterilních zkumavek byly v očkovacím boxu zaočkovány druhy kvasinek z agarových ploten podle Tab. 1. Kultury byly kultivovány po dobu 24 hodin na třepačce při 22°C při 220 rpm.

Druhý den byly kultury kvasinek sterilně přeneseny do mikrozkušavek. Všechny druhy kvasinek byly pozorovány pod optickým mikroskopem s imerzním olejem (zvětšení 1 000x) za účelem zjištění případné kontaminace. Dále bylo změřeno OD_{600} pro 20krát ředěnou kulturu kvasinek. Ze změřené absorbance bylo vypočteno potřebné ředění kultur kvasinek k dosažení $OD_{600}=1$. Takto byly kultury kvasinek naředěny, následně centrifugovány 1 minutu při 14 000 rpm, supernatant byl odlit a k sedimentu bylo pipetováno 1 ml sterilní vody. Opět následovala centrifugace, supernatant byl odpipetován a sediment byl opět rozsuspendován v 1 ml sterilní vody. Takto získané ředění kultur kvasinek bylo dále naředěno 10x, 100x a 1 000x.

Byly nachystány dvě sady tuhých médií ke sterilaci, jedna sada obsahovala 4 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 4 g/l KH_2PO_4 , 0,7 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ a 30 g/l agaru, druhá sada obsahovala 2 g/l KH_2PO_4 a 30 g/l agaru. Obě sady obsahovaly 0,5% (w/v) substráty: D-glukóza monohydrát, bramborový rozpustný škrob, laktóza monohydrát, glycerol, syrovátka, D-manóza a D-xylóza a také kontrolní médium bez substrátu. Po sterilaci bylo do druhé sady médií přidáno 1,33 ml roztoku vitamínů (Yeast Nitrogen base without Amino Acids) rozpuštěných ve vodě a sterilně přefiltrovaných. Média byla sterilně nalita do osmnácti misek. Přehled připravených médií je uveden v Tab. 10.

Tab. 10: Přehled použitých médií pro „drop“ test.

Použitá chemikálie	Petriho misky	
	Bez vitamínů (20 ml)	S vitamíny (20 ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g/l	-
KH ₂ PO ₄	4 g/l	2 g/l
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,696 g/l	-
Agar	30 g/l	30 g/l
Yeast Nitrogen base	-	1,33 ml

Na připravené misky s médiem byly rozpipetovány 3 μl ředěných kultur kvasinek podle Tab. 11.

Tab. 11: Rozmístění kvasinek na tuhém médiu pro „drop“ test. Označení kvasinek podle Tab. 1.

Ředění	Označení kvasinky							
	2	3	10	11	12	18	19	20
1x	●	●	●	●	●	●	●	●
10x	●	●	●	●	●	●	●	●
100x	●	●	●	●	●	●	●	●
1 000x	●	●	●	●	●	●	●	●

4.4.2.2 Kultivace karotenogenních kvasinek a odběr vzorků

Kvasinky byly sterilně zaočkovány na agarovou plotnu. Další den byly sterilně přeočkovány do 16 Erlenmayerových baněk s 20 ml YPD média (10 g/l kvasničného autolyzátu, 20 g/l peptonu a 20 g/l D-glukózy rozpuštěné ve vodě), každý druh byl inokulován do dvou baněk. Následující den byly přeneseny do 50 ml inokulačního média podle Tab. 12 tak, aby finální OD inokula bylo 0,5. Kvasinky byly ponechány růst na třepačce při 22°C do druhého dne.

Bylo připraveno a sterilováno 16 Erlenmayerových baněk se 100 ml produkčního média. Bylo změřeno OD inokula při vlnové délce 600 nm a bylo vypočteno jejich ředění do produkčního média na finální hodnotu OD₆₀₀ 0,5. Kvasinky byly 2krát promyty od růstového média produkčním médiem a přeneseny do 100 ml produkčního média (pH 4,9, Tab. 12).

Tab. 12: Složení inokulačního a produkčního média.

Použitá chemikálie	Inokulační médium	Produkční médium
D-glukóza monohydrát	33 g/l	33 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g/l	2,8 g/l
KH ₂ PO ₄	4 g/l	4 g/l
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,696 g/l	0,696 g/l

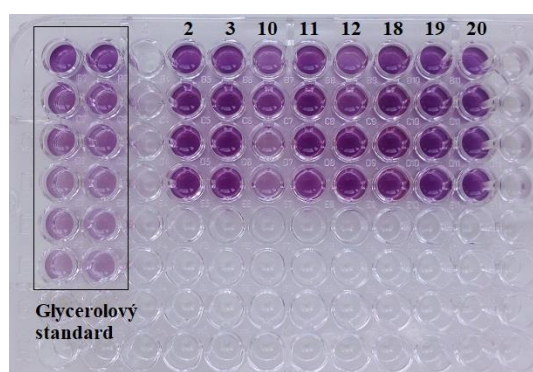
Kultury kvasinek byly kultivovány při 22°C a v následujících časových intervalech byly odebírány vzorky: po 24, 32, 48, 56 a 72 hodinách. OD bylo měřeno při 600 nm. Bylo odebíráno 10 ml metabolitů k následné extrakci karotenoidů a lipidů, vzorky byly centrifugovány, supernatant byl odlit do mikrozskumavek na změření utilizace glukózy v produkčním médiu. Vzorky pro měření metabolitů a glukózy byly zamrazeny. Dále byly odebírány 3 ml kultury do kyvet, kvasinky byly promyty 2krát 2 ml destilované vody, poté byly kvasinky přeneseny na předem zvažené misky, které byly umístěny do sušárny na 2 dny a následně do exsikátoru

k biomase přidány 2 ml 0,034% roztoku $MgCl_2$ a biomasa byla vortexována 10 minut. Následně byly vzorky centrifugovány 5 minut na 7 000 rpm při 4 °C. Poté byla pomocí vakuové vývěvy odstraněna vrchní fáze extrakce. K organické fázi byly přidány 4 ml chloroformu, destilované vody a methanolu v poměru 48:47:3 (v/v/v) a vzorky byly vortexovány 10 s. Následovala centrifugace 5 minut na 7 000 rpm při 4 °C. Poté byla pomocí vakuové vývěvy odstraněna vrchní fáze extraktu. Organická fáze byla převedena do skleněné odměrné zkumavky. Zbytek biomasy a skleněných kuliček bylo promyto 4 ml chloroformu a methanolu v poměru 2:1 (v/v) a k tomu 2,5 ml chloroformu, destilované vody a methanolu v poměru 48:47:3 (v/v/v) a vzorky byly vortexovány 20 min. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při 7 000 rpm ve vychlazené centrifuze. Poté byla pomocí vakuové vývěvy odstraněna vrchní fáze extrakce. Organická fáze byla převedena do skleněné odměrné zkumavky. Vzorky v chloroformu byly rozděleny na dvě poloviny a uloženy pro analýzu karotenoidů a ergosterolu pomocí HPLC a enzymatické stanovení lipidů.

4.4.2.5 Enzymatické stanovení lipidů

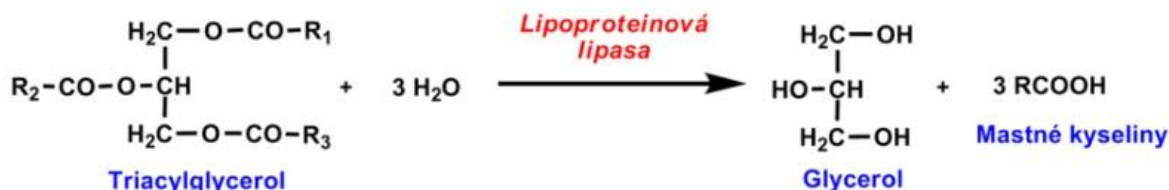
Triacylglyceroly byly stanoveny pomocí Serum Triglyceride Determination kitu (Sigma-Aldrich) obsahující Triglyceride reagent a Free glycerol reagent [73]. Stanovení je založeno na štěpení TAG lipoproteinovou lipasou za vzniku glycerolu a mastných kyselin. Stanovovaný glycerol je následně dvoukrokově oxidován za vzniku H_2O_2 , který v reakci s 4-aminoantipyrinem a *N*-ethyl-*N*-(3-sulfopropyl) *m*-anisidinem sodným dává chinoniminové barvivo, které má absorpční maximum při 540 nm a dává fialové zabarvení (Obr. 12 Obr. 13).

Lyofilizát Free glycerol reagent byl rozpuštěn ve 40 ml mili-Q vody a lyofilizát Triglyceride reagent byl rozpuštěn v 10 ml mili-Q vody. Roztoky byly promíchány a smíseny dohromady. Bylo pipetováno 15 μ l vzorku pro stanovení lipidů do 96-jamkové mikrotitrační destičky. Poté bylo na destičku pipetováno 10 μ l 1x, 2x, 3x, 4x, 5x a 6x ředěného glycerolového standardu (Obr. 12). Na místo blanku a vzorku na destičce bylo pipetováno 10 μ l destilované H_2O . Následně bylo na destičku naneseno 200 μ l reagentu. Destička byla umístěna do ELISA readeru, který byl nastaven na inkubační teplotu 37°C a byla měřena kinetika probíhající reakce při vlnové délce 562 nm. Absorbance byly odečteny v čase nejvyšší absorbance pro daný vzorek a standard. Obsah glycerolu ve vzorku byl vypočten z kalibrační křivky glycerolu, kde koncentrace standardu 2,5 mg/ml odpovídá koncentraci trioleinu 0,26 mg/ml.



Obr. 12: ELISA destička s reakční směsí stanovující TAG ve vzorku. Označení kvasinek podle Tab. 1.

1. Hydrolýza triacylglycerolů



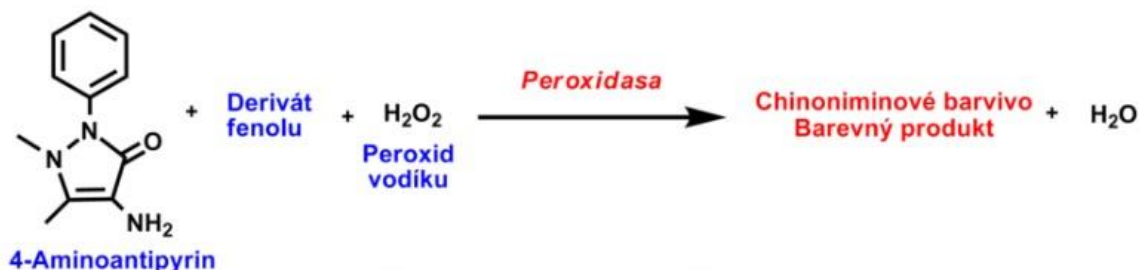
2. Fosforylace glycerolu



3. Oxidace glycerol-3-fosfátu a vznik peroxidu vodíku



4. Oxidační kopulace a vznik barevného produktu



Obr. 13: Princip enzymatického stanovení TAG. Převzato z [74].

4.4.2.6 Stanovení karotenoidů a ergosterolu pomocí RP-HPLC/PDA

Získaný vzorek po extrakci kvasinkové biomasy byl odpařen na vakuové rotační odparce a odparek by rozpuštěn v 1 ml chloroformu určeného pro HPLC a následně byl zfiltrován přes 0,2 μm filtr pomocí stříkačky. K chromatografické analýze karotenoidů a ergosterolu byla použita soustava RP-HPLC/PDA od firmy Thermo Fisher Scientific, USA. Analyzovaná data byla zpracovaná chromatografickým softwarem X-Calibur. Vzorek byl vstříknut do injektoru a nanesen na nepolární chromatografickou kolonu C18 Kinetex of firmy Phenomenex, USA. Mobilní fáze A byla složena z acetonitrilu, methanolu a 0,1 mM TRIS-HCl (pH 8) v poměru 84:2:14 a mobilní fáze B byla složena z ethylacetátu a methanolu v poměru 40:60. Režim gradientové eluce byl nastaven následovně: 0–11 minuta 100% mobilní fáze A, 12–17 minuta 100% mobilní fáze B a 18–23 minuta 100% mobilní fáze A. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Separace nepolárních látek probíhala při 25°C po dobu 23 minut a detekována na pomoci

detektoru diodového pole (PDA), který dokáže snímat celé spektrum v reálném čase. Karotenoidy byly měřeny při vlnové délce 450 nm a ergosterol při vlnové délce 285 nm. Množství látek bylo vypočteno z ploch píků v chromatogramu v porovnání se standardy (β -karoten a ergosterol). Byl vypočten i poměr β -karotenu vůči celkovým karotenoidům.

4.4.3 Mutageneze

Na fyzikální mutagenezi UV zářením byl vybrán jeden druh karotenogenní kvasinky na základě nejlepší produkce karotenoidů, lipidů a ergosterolu vztažených na suchou biomasu podle kapitol 4.4.2.44.4.2.5 a 4.4.2.6.

Na sadu misek s YPD médiem byla zaočkovaná kultura *R. toruloides* CCY 20-7-28, po 72 hod kultivace byly jednotlivé misky ozářeny po dobu 1, 3 a 5 min pod UV zářením o vlnové délce 264 nm. Ozářená kultura byla převedena z misek pomocí média bez obsahu zdroje uhlíku do 15 ml kyvet. Z kyvet pak bylo použito 800 μ l kultury na zaočkování tekutých médií s obsahem glukózy, syrovátky a glycerolu (Tab. 14).

Tab. 14: Složení tekutých i pevných médií.

Použitá chemikálie	Glukóza	Syrovátka	Glycerol
D-glukóza	30 g/l	5 g/l	-
Lyofilizovaná syrovátka	-	39,2 g/l*	-
Glycerol	-	-	30 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g/l	1,82 g/l	4 g/l
KH ₂ PO ₄	4 g/l	4 g/l	4 g/l
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,696 g/l	0,696 g/l	0,696 g/l
Kvasničný autolyzát	-	1,5 g/l	-

*Množství syrovátky bylo přepočítáno na finální obsah laktózy 30 g/l.

Následujících 24 hodin byly buňky kultivovány bez přístupu světla, aby nedošlo k fotoreparaci případných mutací vzniklých UV zářením. Po 72 hod kultivace byly buňky inokulovány na pevném médiu s 20 g/l agarem (Tab. 14) a s obsahem glukózy, syrovátky a glycerolu. Po 72 hodinách byly vyselektovány kolonie s nejintenzivnějším zbarvením. Po dalších 72 hodinách byly vybrány nejrychleji rostoucí kultury a zočkovány do 5 ml YPD média. Po 24 hodinách byly přeočkovány do produkčního média s obsahem glukózy, syrovátky a glycerolu (Tab. 15) a po 72 hodinách došlo k analýze produkce karotenoidů a lipidů pomocí průtokové cytometrie.

Tab. 15: Složení produkčních médií pro adaptaci mutantních kmenů na odpadní substrát.

Použitá chemikálie	Glukóza	Syrovátka	Glycerol
D-glukóza	30 g/l	5 g/l	-
Lyofilizovaná syrovátka	-	39,2 g/l*	-
Glycerol	-	-	30 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,8 g/l	1,82 g/l	2,8 g/l
KH ₂ PO ₄	4 g/l	4 g/l	4 g/l
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,696 g/l	0,696 g/l	0,696 g/l
Kvasničný autolyzát	1,5 g/l	1,5 g/l	1,5 g/l

*Množství syrovátky bylo přepočítáno na finální obsah laktózy 30 g/l.

Na základě výsledků průtokové cytometrie byly vybrány dvě nejlepší mutantní kolonie pro následnou kultivaci na glukózovém, syrovátkovém a glycerolovém médiu (podle kapitoly

4.4.2.2). Po 72 hodinové kultivaci byly odebrány vzorky pro měření celkových karotenoidů, β -karotenu, ergosterolu a lipidů. Metabolity byly přepočteny na množství suché biomasy.

4.4.3.1 Průtoková cytometrie

Buňky v produkčním médiu pro průtokovou cytometrii byly podle potřeby naředěny. Buňky v syrovátkovém médiu byly navíc dvakrát promyty demineralizovanou vodou.

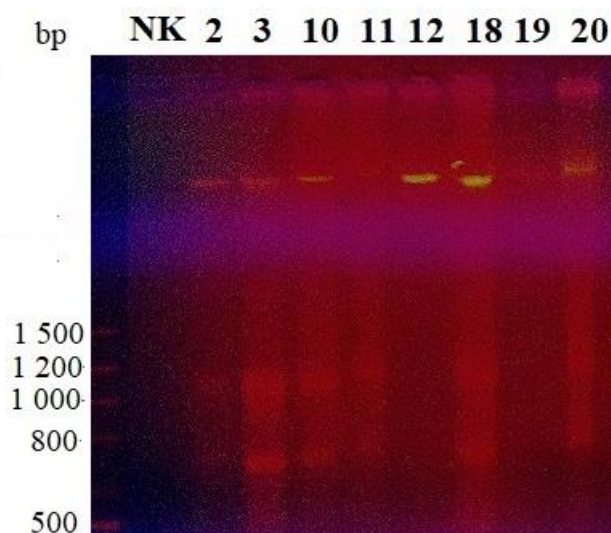
Program průtokového cytometru Apogee byl nastaven na průtok 4,17 $\mu\text{l}/\text{min}$ a objem nasátí vzorku byl 100 μl . Doba měření byla 30 s. Počet buněk byl stanoven z rozptylu přímého i bočního světla (kanál SALS-LALS). Průměrná velikost buněk byla stanovena z rozptylu přímého světla (kanál SALS) a množstvím vnitrobuněčného materiálu bylo stanoveno z rozptylu bočního světla (kanál LALS). Karotenoidy byly stanoveny při 590 nm. Následně byl ke vzorkům přidán 1 μl fluorescenčního barviva – nilské červeně a byly stanoveny lipidy při 590 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Molekulární část

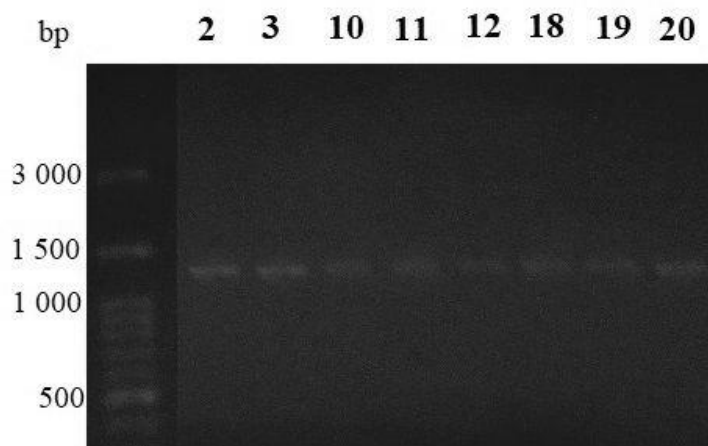
5.1.1 Izolace DNA, PCR a gelová elektroforéza

Po ověření úspěšnosti izolace DNA karotenogenních kvasinek na gelové elektroforéze (Obr. 14) byla třeba amplifikovat požadovaný úsek DNA. Z naměřených hodnot koncentrací DNA na UV/VIS spektrofotometru bylo DNA ředěno na vhodnou koncentraci v rozmezí 1 ng-1 µg.



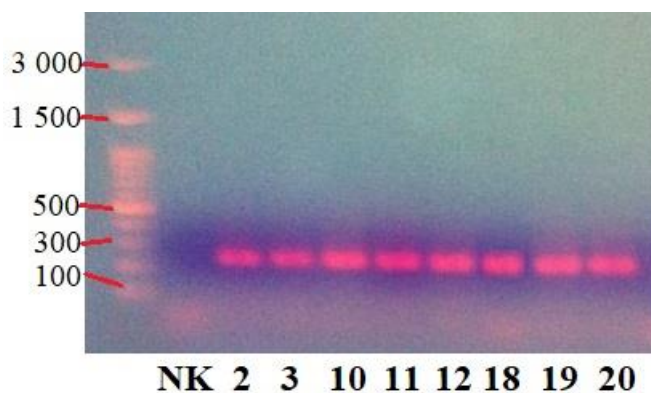
Obr. 14: Separovaná DNA karotenogenních kvasinek po fenol-chloroformové extrakci na 1,8% agarózovém gelu. Označení kvasinek podle Tab. 1.

„Nested“ PCR nachází využití při identifikaci a taxonomickém zařazení kvasinek, kde jsou nejčastěji amplifikovány hypervariabilní oblasti DNA ITS1, 5,8S-ITS2 a oblast velké ribosomální jednotky (26S) D1/D2. Tento typ PCR je nejčastěji používán kvůli vysoké citlivosti a specifitě. Optimalizace metody „nested“ PCR spočívala ve výběru vhodného kitu pro amplifikaci DNA. Pro amplifikaci dlouhých úseků rDNA s primery ITS1 a NL4 byly vhodné kity KAPA2G Long Range a kit Q5 High-Fidelity DNA polymerase od firmy BioLabs. Top-Bio kit a kit KAPA2G Robust nebyly vhodné pro amplifikaci oblastí ITS1-5,8S-ITS2 a D1/D2 ribosomální DNA pravděpodobně kvůli vysokému zastoupení GC bází. Gelovou elektroforézou byla určena přibližná velikost dané oblasti DNA a to ~1 300 bp (Obr. 15).

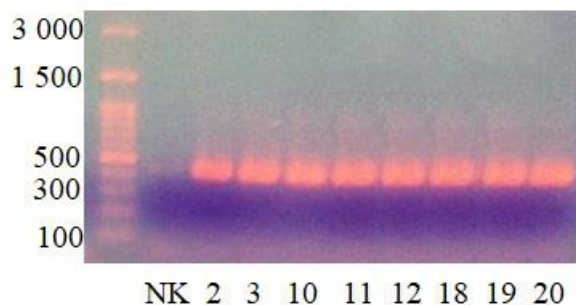


*Obr. 15: Amplifikovaný dlouhý úsek rDNA karotenogenních kvasinek na 1,8% agarózovém gelu.
Označení kvasinek podle Tab. 1.*

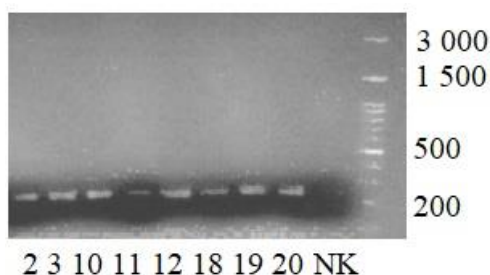
Pro amplifikaci krátkých úseků rDNA, což jsou ITS1, 5,8S-ITS2 a D1/D2 byly vhodné všechny tři použité kity – KAPA2G Robust, KAPA Long Range i Q5 High-Fidelity DNA polymerase. Každý úsek rDNA vyžadoval pro amplifikaci vlastní sadu vnitřních primerů, ITS1 úsek byl amplifikován mezi primery ITS1-GC a ITS2, 5,8S-ITS2 oblast byla namnožena pomocí primerů ITS3 a ITS4-GC a D1/D2 oblast velké ribozomální jednotky rDNA byla amplifikována pomocí primerů NL1 a LS2. ITS1 oblast vybraných druhů karotenogenních kvasinek byla odhadnuta na 250 bp (Obr. 16). Velikost oblasti 5,8S-ITS2 činí cca 450 bp (Obr. 17) a v případě D1/D2 úseku se jedná o velikost cca 280 bp (Obr. 18).



*Obr. 16: Oblast ITS1 rDNA vybraných druhů karotenogenních kvasinek na 1,8% agarózovém gelu.
Označení kvasinek podle Tab. 1.*



Obr. 17: Oblast 5,8S-ITS2 rDNA vybraných druhů karotenogenních kvasinek na 1,8% agarózovém gelu. Označení kvasinek podle Tab. 1.



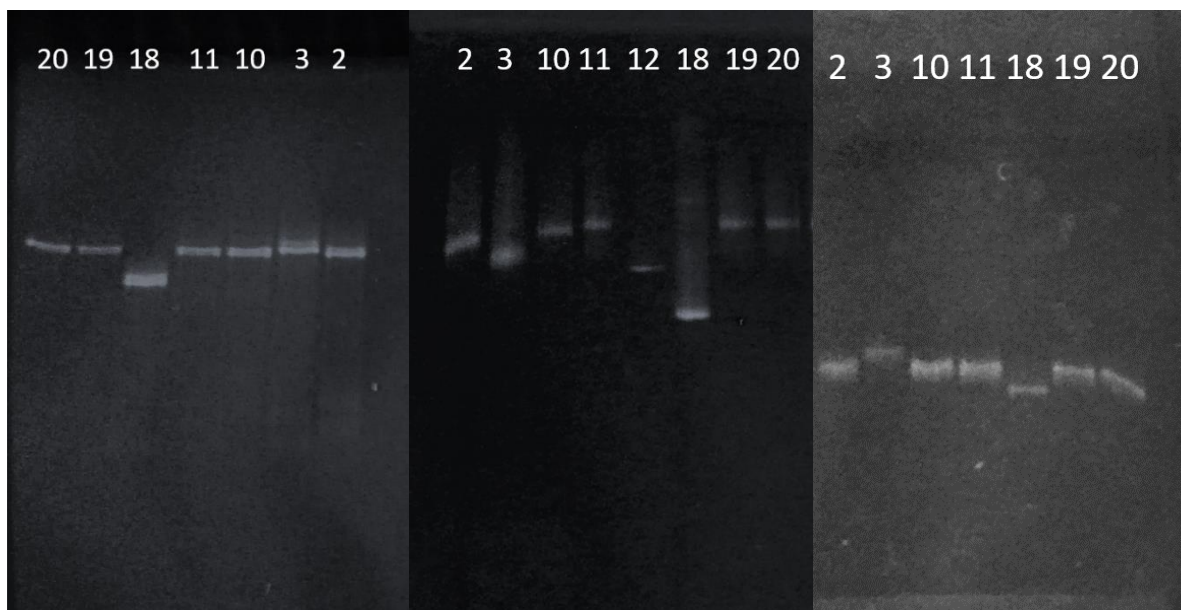
Obr. 18: Oblast D1/D2 rDNA vybraných druhů karotenogenních kvasinek na 1,8% agarózovém gelu. Označení kvasinek podle Tab. 1.

5.1.2 DGGE

DGGE je vhodná metoda k identifikaci mikroorganismů a také k vyhledávání mutací na základě rozdílných sekvencí DNA. Jedná se o metodu otisku prstu a spočívá v postupné denaturaci vodíkových vazeb mezi vlákny DNA v gradientu denaturačních činidel. Metoda je vhodná k analýze sekvencí do délky 500 bp, proto byly analyzovány oblasti ITS1, 5,8S-ITS2 a D1/D2 zvlášť.

Pro analýzu ITS1 a 5,8S-ITS2 oblastí rDNA bylo použito denaturační rozmezí 50–70 % denaturačních činidel formamidu a močoviny. Pro stanovení D1/D2 oblastí bylo použito denaturační rozmezí 30–50 %, ale tato koncentrace denaturačních činidel nebyla dostatečná a oblast DNA nebyla zcela denaturovaná, proto bylo pro další analýzu dané oblasti zvoleno vyšší denaturační rozmezí mezi 50 a 80 %.

Analýzou oblastí ITS1 (Obr. 19 vlevo) a D1/D2 (Obr. 19 vpravo) byly zjištěny rozdíly pouze u druhů *R. glutinis* CCY 20-2-26 a *R. toruloides* CCY 20-7-28. Analýza regionu 5,8S-ITS2 rDNA (Obr. 19 uprostřed) byla zjištěna odlišnost ještě *S. roseus* CCY 19-6-4. Zbylé druhy kvasinek nebylo možné z analýzy DNA pomocí DGGE mezi sebou odlišit, až sekvencí dlouhých oblastí rDNA byly kvasinky detailněji porovnány. Z porovnání těchto tří DGGE gelů byl určen region 5,8S-ITS2 jako nejvariabilnější, a proto byl tento region vybrán na DGGE mutantních kmenů.



Obr. 19: DGGE ITS1, 5,8S-ITS2 a D1/D2 regionů ribozomální DNA v tomto pořadí. Označení kvasinek podle Tab. 1.

5.1.3 Sekvence oblastí ITS1-5,8S-ITS2 a D1/D2

Kvasinkový genom obsahuje ITS1 a ITS2 regiony, které jsou odděleny 5,8S rDNA. D1/D2 oblast náleží velké ribozomální podjednotce (26S) rDNA. Regiony ITS1, ITS2 a D1/D2 jsou mnohem variabilnější než sousední rDNA sekvence genu pro rDNA, a tak zabezpečují lepší oddělení blízké příbuzných druhů. Proto jsou tyto regiony nejvíce sekvenovanými úseky DNA u kvasinek.

Po izolaci DNA byla provedena amplifikace dlouhých úseků rDNA karotenogenních kvasinek. Tyto úseky byly přečištěny za použití Carrier-ACRYL. Po ověření úspěšnosti PCR pomocí gelové elektroforézy byly vzorky poslány na vyhodnocení firmou SEQme s.r.o. [71]. Sekvence byla zapsána ve formátu FASTA (Obr. 20), tento formát je možné otevřít v programu SnapGene, následně byla sekvence vyhodnocena pomocí algoritmu BLAST a porovnána s databází NCBI [72]. FASTA formát obsahoval kromě A, C, G a T i jiné symboly, které jsou popsány v Tab. 16.

Tab. 16: Význam symbolů ve FASTA formátu.

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

```

GRCSTWATWRRRAAYAGCAGWRTCWAKTTRTSKTGGGCSAAGCTWYKCTWCAASCTGGTKTATTTGKWCCCTCAGGAAAATGMGTACAGAGGGTAACCCWT 100
CAGAAACTGCTACATGTTCCCTACGATTTCCGCCCGGAAAAAYTGAWGCCCTTTGTCGRACGCATCTCWTGCTCCGCGCATCWATTCTGACTTCAGGCGT 200
TTCCCTTCCAACATGTTACAGTGCTGTTTCTCTCTTTCCAAAGTGCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACGTGTTTCCGAACAGTCTCTCGCCAGTATTTA 300
GCTTTAGATGGAAATTTACCACCCAATTTGAGCTGCGTTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAAGTGATCAGACAACATCGGGCATCTCACTGTGCACTG 400
YGTTCACGACTGKAACGCCCTGKCCCAGGAGACTAGTGTCCGGGCAGAAAGCGGGCCAYAGGGCTCGAGATTACAATTCGGAGGGCGAAAAGCGCCAGAS 500
TACAAATTTGACCTTTTCCCGCTCCCTCGCTGCTACTGGAGTAATCCTTGTWAGTTATCTTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGTAA 600
CCCTGCCGGATTGGAGATCTAATCTAAAAGGTAGACTTTTAGGGATTAGAACKTTCYGAACAAGTTGGMTCWCKAACACKKATGCCACTTACTCTCA 700
GCAAAAAGTCTACTGCACCRAGTCGTTCAAASSTTGWATCGSGATGCTAATGCMTTACGAACGAKCTAKGGCGAAGCCAGTWCCTCAGAAATGCTAGCRCS 800
CACGCGTKTGCAAKTACGKGGGRRTTGAARAMTTCAGGAAACTMCAGMGACATACTCTYCGGGATACCATACAGTGCAGGAWRCRTCAAAGATTCTTGGGA 900
TCASGGATTCTGCATTCAAATTRSTACGGATATCGCTGCGTYTTRACGATCCAAGMCCMAMTAGTCCGTTYTGAAAGYTTTWTATGTTAYGAKWCRKA 1000

```

Obr. 20: Sekvence rDNA kvasinky *S. roseus* ve formátu FASTA.

Sekvence byly porovnány s databází NCBI a vyhodnoceny na základě tzv. „bit skóre“. Výsledky sekvenace odpovídají analýze sekvencí pomocí metody DGGE, pode níž jsou odlišné druhy pouze *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26, *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4 a *Rhodotorula toruloides* CCY 20-7-28. Zbylých pět druhů karotenogenních kvasinek bylo identifikováno podle NCBI jako *Rhodotorula mucilaginosa*. *R. mucilaginosa* je jeden z nejrozšířenějších druhů karotenogenních kvasinek a sekvence tohoto druhu je tedy i v databázi jednou z nejzastoupenějších. Výsledek identifikace může být ovlivněný i dalším faktem, a to že některé kmeny byly zakoupeny před delší dobou, kdy ještě nebyla taxonomie kvasinek rozdělená na základě rDNA sekvencí, ale pouze na základě jejich fenotypových vlastností. V dnešní době jsou kvasinky identifikovány modernějšími metodami, mezi které patří DGGE, RFLP, a především sekvenace variabilních úseků. Dalším kritériem je, že DNA vzorky určené k sekvenaci měly nízkou koncentraci, a proto jsou výsledky sekvenace oblastí úseku rDNA méně spolehlivé. Signály při sekvenaci obsahovaly chyby, které zvyšují variabilitu těchto sekvencí v porovnání mezi jednotlivými kmeny. Tento fakt je třeba brát v potaz při hodnocení výsledků uvedených v Tab. 17 a pro jejich definitivní identifikaci je třeba opakovat sekvenaci rDNA oblasti u těchto kvasinek.

Tab. 17: Porovnání sekvencí oblastí rDNA karotenogenních kvasinek s databází NCBI.

Sbírkové číslo	Druh kvasinky	Shoda s databází NCBI
CCY 20-2-33	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
CCY 20-2-26	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
CCY 19-4-6	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
CCY 19-20-3	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
CCY 19-6-4	<i>Sporobolomyces roseus</i>	<i>Sporobolomyces roseus</i>
CCY 20-7-28	<i>Rhodotorula toruloides</i>	<i>Rhodotorula toruloides</i>
CCY 19-9-6	<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
CCY 19-6-20	<i>Sporobolomyces metaroseus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

5.2 Fenotypová charakterizace

5.2.1 „Drop“ test

Tato technika je vhodná k rychlé fenotypové charakterizaci mikroorganismů. Po kultivaci lze stanovit, zda je daná kvasinka schopná růstu na vybraném substrátu. Toto stanovení je oproti klasické kultivaci rychlejší, méně pracné i méně časově náročné a další výhodou je také mnohem menší potřeba chemikálií.

Osm druhů karotenogenních kvasinek bylo kultivováno v inokulačním a produkčním médiu a následně byly naneseny na agarové plotny obsahující substráty glukózu, manózu, xylózu, laktózu, syrovátku, škrob a glycerol. Každý substrát byl nanesen na dvě misky ve dvou variantách, a to se zdrojem vitamínů skupiny B vhodnými pro kultivaci kvasinek a bez tohoto komplexu (viz kapitola 4.4.2.1).

Nejvhodnějšími substráty jsou jednoduché cukry s šesti uhlíky, a to glukóza a manóza, sedm druhů karotenogenních kvasinek z osmi na těchto substrátech vyrostlo se silnou odezvou. K růstu kvasinek na těchto substrátech ještě viditelně přispěl přídavek vitamínů. Pentózu xylózu už kvasinky nejsou schopny využít v takové míře jako hexózy, ale *Sporobolomyces salmonicolor* CCY 19-4-6, kvasinka s nejnižším nárůstem, byla schopná na tomto substrátu vytvořit oddělené kolonie, na misce bez vitamínů narostla mírně v neřaděné úrovni a na misce s dusíkatými látkami narostla po třetí úroveň ředění. *S. salmonicolor* CCY 19-4-6 narostla oproti negativní kontrole i na syrovátce bez i s vitamíny. Nejméně náročné kvasinky na výběr substrátu jsou *Rhodotorula glutinis* CCY 20_2_26 a *R. toruloides* CCY 20-7-28, které byly schopné využít do malé míry kromě glukózy a manózy i xylózu, laktózu a glycerol, avšak laktózu a glycerol pouze na miskách bez přídavku vitamínů (Obr. 21, Tab. 18). Nejslabším substrátem, a to bez známky nárůstu jediné kvasinky, se jevil škrob, z tohoto důvodu nebyl škrob zařazen mezi substráty pro adaptaci mutantních kmenů karotenogenní kvasinky *R. toruloides* CCY 20-7-28. Karotenogenní kvasinky buď neobsahují enzymy amylasy, které jsou schopné hydrolyzovat glykosidické vazby škrobu, nebo mají amylasy vyšší aktivitu při vyšších teplotách, jak je tomu ve článku Carrasca *et al.* (2016), kde byla pozorována vyšší aktivita amylasy testovaných kvasinek v rozmezí pH 5,4-6,2 a při 30–37°C s výjimkou *R. glacialis*, která vykazovala nejvyšší aktivitu amylasy při 15°C [75].

	Bez vitamínů								S vitamíny								Ředění
	2	3	10	11	12	18	19	20	2	3	10	11	12	18	19	20	
Bez substrátu																	1x 10x 100x 1 000x
Glukóza																	1x 10x 100x 1 000x
Mannóza																	1x 10x 100x 1 000x
Xylóza																	1x 10x 100x 1 000x
Laktóza																	1x 10x 100x 1 000x
Syrovátka																	1x 10x 100x 1 000x
Škrob																	1x 10x 100x 1 000x
Glycerol																	1x 10x 100x 1 000x

Obr. 21: „Drop“ test provedený s osmi druhy vybraných karotenogenních kvasinek na sedmi vybraných substrátech. Označení kvasinek podle Tab. 1.

Tab. 18: Přehledné shrnutí růstu vybraných karotenogenních kvasinek na rozdílných substrátech.

	Substrát													
	Glukóza		Mannóza		Xylóza		Laktóza		Syravátka		Škrob		Glycerol	
	Bez	S*	Bez	S*	Bez	S*	Bez	S*	Bez	S*	Bez	S*	Bez	S*
<i>R. glutinis</i> 20_2_33	-	++	+	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>R. glutinis</i> 20_2_26	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. salmonicolor</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. shibatanus</i>	-	++	+	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. roseus</i>	++	++	++	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. toruloides</i>	++	++	+	++	+	++	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. pararoseus</i>	+	++	+	++	-	++	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. metaroseus</i>	+	++	+	++	-	++	+	-	-	-	-	-	+	-

* Agarová miska s přidavkem dusíkatých látek bez aminokyselin vhodných pro kultivaci kvasinek.

+ Slabý výsledek

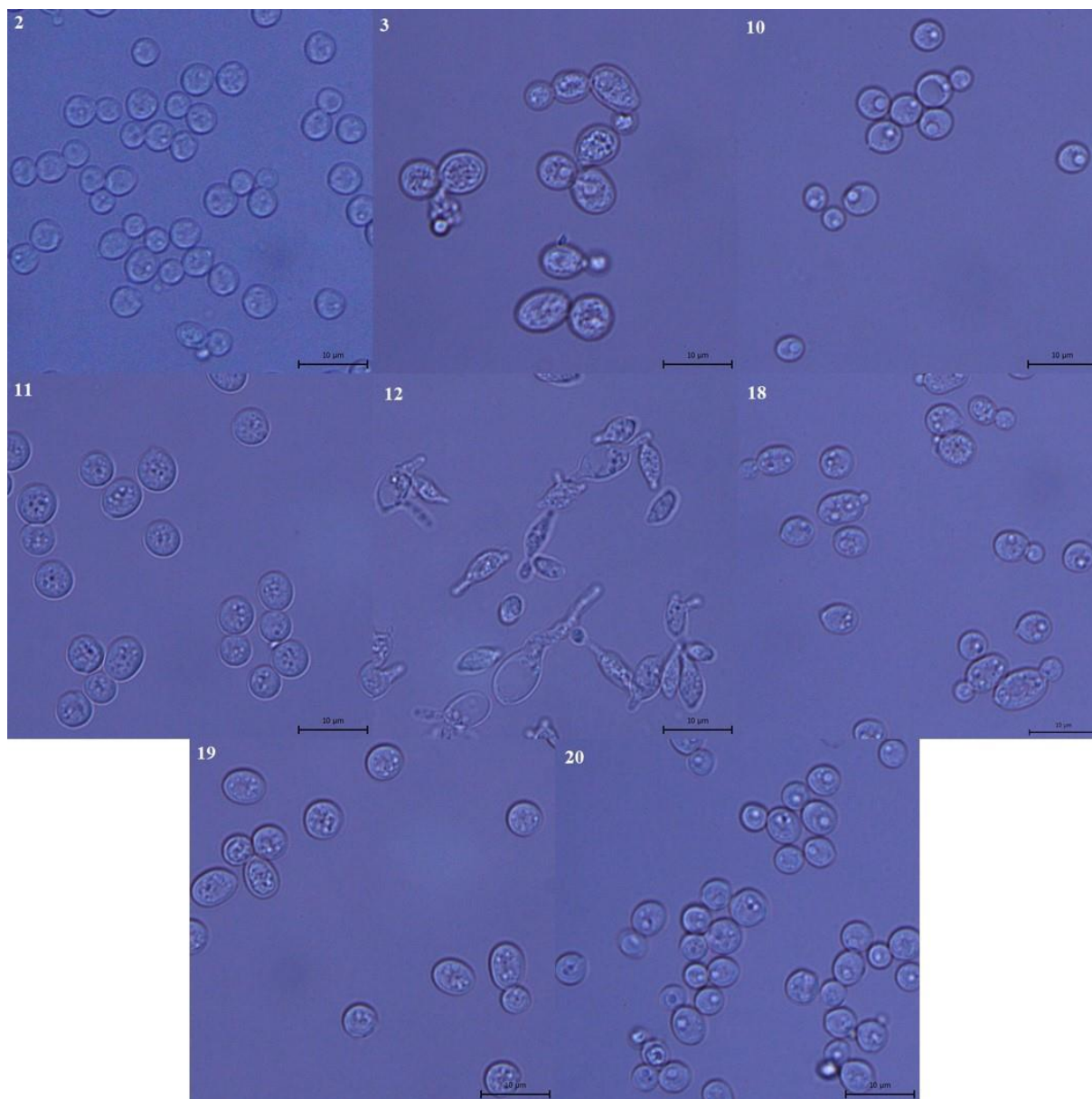
++ Silný výsledek

- Negativní výsledek

V porovnání s daty z [5] byl růst kvasinky *R. glutinis* 20-2-26 a *R. toruloides* CCY 20-7-28 rozdílný pouze na laktóze, kde byl nárůst negativní. Výsledky se shodovaly se substráty glukóza, xylóza, škrob a glycerol.

5.2.2 Morfologie buněk

Morfologie se zabývá stavbou buněčné struktury organismů. Kvasinky byly mikroskopicky pozorovány po kultivaci na glukózovém produkčním médiu po 72 hodinách kultivace (Obr. 22). Buňky karotenogenních kvasinek *R. glutinis* CCY 20-2-33 (2), *S. salmonicolor* (10), *S. shibatanus* (11), *S. pararoseus* (19) a *S. metaroseus* (20) jsou kulaté. Buňky kvasinky rodu *Sporobolomyces* jsou elipsoidní až silně protáhlé, což splňuje pouze *S. roseus* (12), která má tendenci tvořit mycelium. *R. glutinis* CCY 20-2-33 obsahuje z vybraných karotenogenních kvasinek nejméně lipidových tělísek. Nejvýraznější lipidová tělíska má *S. salmonicolor* a *S. metaroseus* a podle jejich morfologie by se dalo zhodnotit, že se jedná o identické kvasinky. *R. glutinis* CCY 20-2-26 (3) obsahuje nejvíce lipidových tělísek a její tvar je kulatý až mírně oválný. Buňky *R. toruloides* CCY 20-7-28 (18) kultivované na glukóze jsou kulaté až mírně oválné, buňky jsou většinou samostatné a netvoří shluky. Obsah buněk je granulovitý.

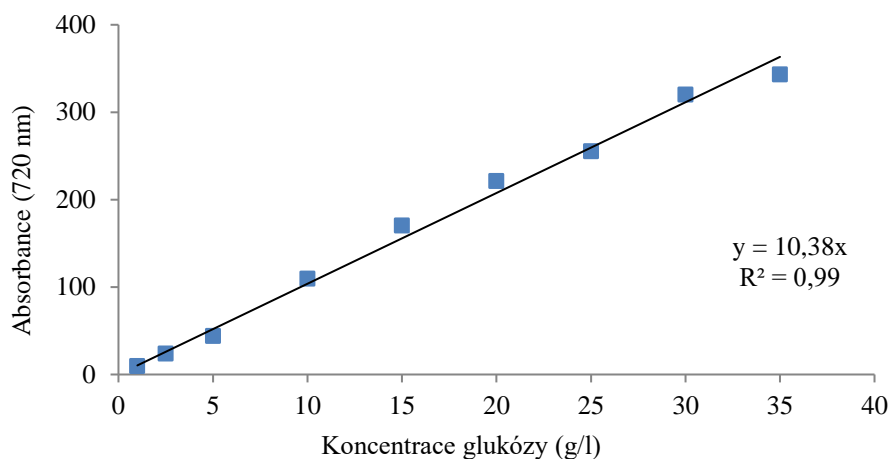


Obr. 22: Mikroskopické obrázky karotenogenních kvasinek. Označení kvasinek je v levém horním rohu fotky a měřítko v pravém dolním rohu udává velikost 10µm. Označení kvasinek podle Tab. 1.

5.2.3 Růstové charakteristiky

Pro charakterizaci růstu kvasinkové kultury se konstruuje růstová křivka. Tato křivka znázorňuje časovou závislost optické hustoty, která je úměrná koncentraci buněk v suspenzi. S cílem najít nejrychlejšího producenta karotenoidů a lipidů byly provedené růstové charakteristiky karotenogenních kvasinek, jelikož produkce karotenoidů probíhá především ve stacionární fázi růstu. Stacionární fáze značí, že počet buněk se již nemění, ale že narůstají do původní velikosti.

V rámci jedné kultivace pro sledování růstové křivky bylo měřeno OD_{600} , biomasa a schopnost utilizace cukrů. Koncentrace glukózy v médiu byla stanovena metodou Somogyi-Nelson s chromogenním reakčním činidlem a vypočtena z kalibrační křivky (Graf 1).

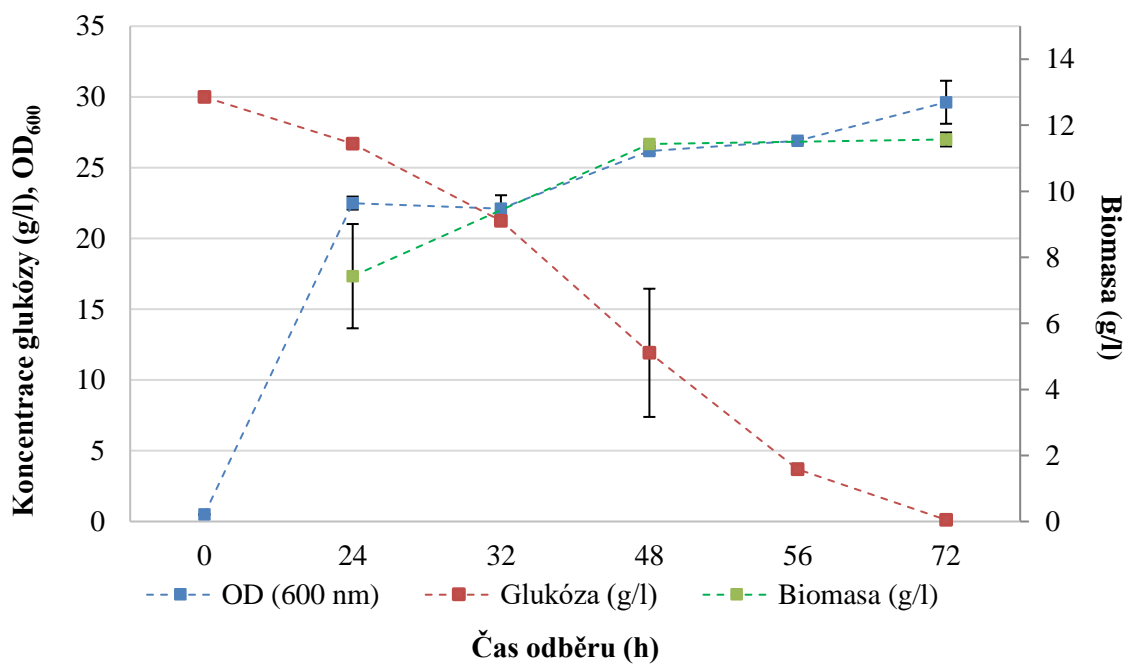


Graf 1: Kalibrační křivka pro stanovení cukrů ve vzorku značí závislost absorbance při 720 nm na koncentraci glukózy. Kalibrace metody dle Somogyi-Nelsona.

Vysoký nárůst buněk v kultuře *R. glutinis* CCY 20-2-33 i CCY 20-2-26 a *S. shibatanus* proběhl do 24 h, poté byl růst zpomalen a pravděpodobně by bylo množení buněk zastaveno v 72 h, jelikož v médiu byla zužitkována všechna glukóza (Graf 2, Graf 3 a Graf 5). Kvasinka *S. salmonicolor* je nejpomaleji rostoucí a za 72 h růstu byla schopná zutilizovat pouze 7 g glukózy (Graf 4). *S. roseus*, *R. toruloides*, *S. pararoseus* a *S. metaroseus* mají stejný průběh růstu, jako *R. glutinis* CCY 20-2-33, ale v médiu neměly ještě zužitkovanou všechnu glukózu a buňky by se pravděpodobně ještě několik hodin množily a až poté by nastala stacionární fáze (Graf 6, Graf 7, Graf 8 a Graf 9). *R. glutinis* CCY 20-2-33 je z vybraných karotenogenních kvasinek nejrychleji se množící kvasinka.

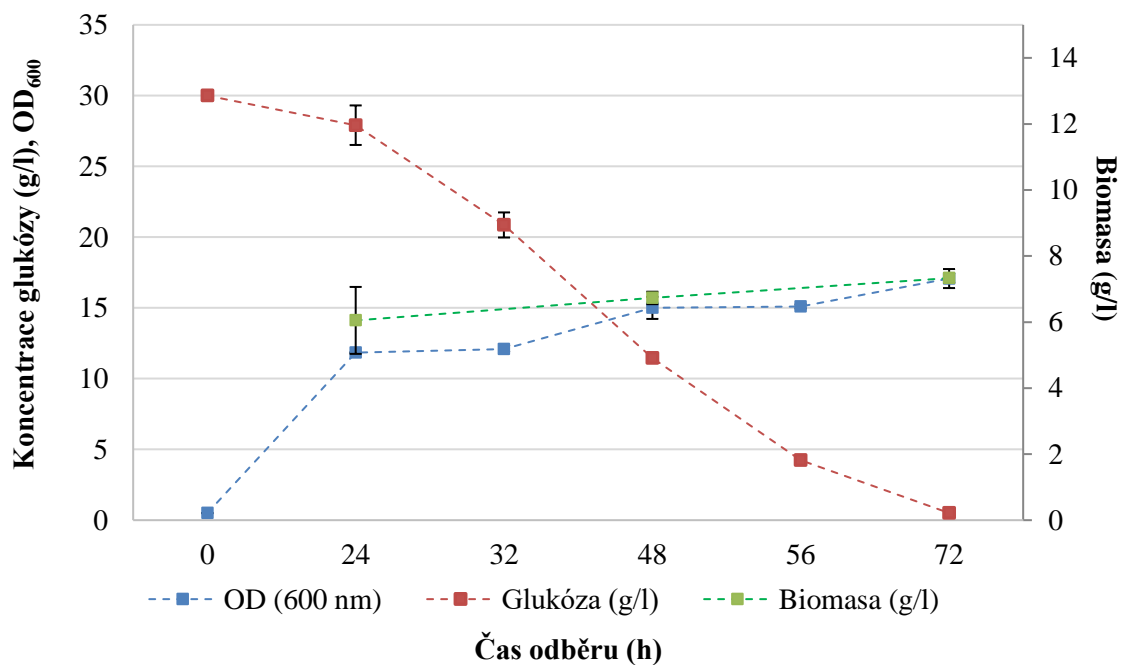
Všechny karotenogenní kvasinky tedy měly znatelný nárůst buněk, exponenciální fázi, do 24 hodiny růstu na glukóze, poté byl růst zpomalen, ale nebyl zcela zastaven ani po 72 h růstu. Měření množství biomasy koreluje s růstovými křivkami měřenými spektrofotometricky u všech osmi druhů karotenogenních kvasinek. Buňky se tedy množí do doby vyčerpání glukózy v médiu, poté by bylo OD stále stejné, ale nárůst biomasy by byl znatelný z důvodu produkce sekundárních metabolitů. Všechny analyzované kvasinky tedy vykazují diauxii (dvě růstová maxima) s prodlouženou stacionární fází.

Rhodotorula glutinis CCY 20-2-33

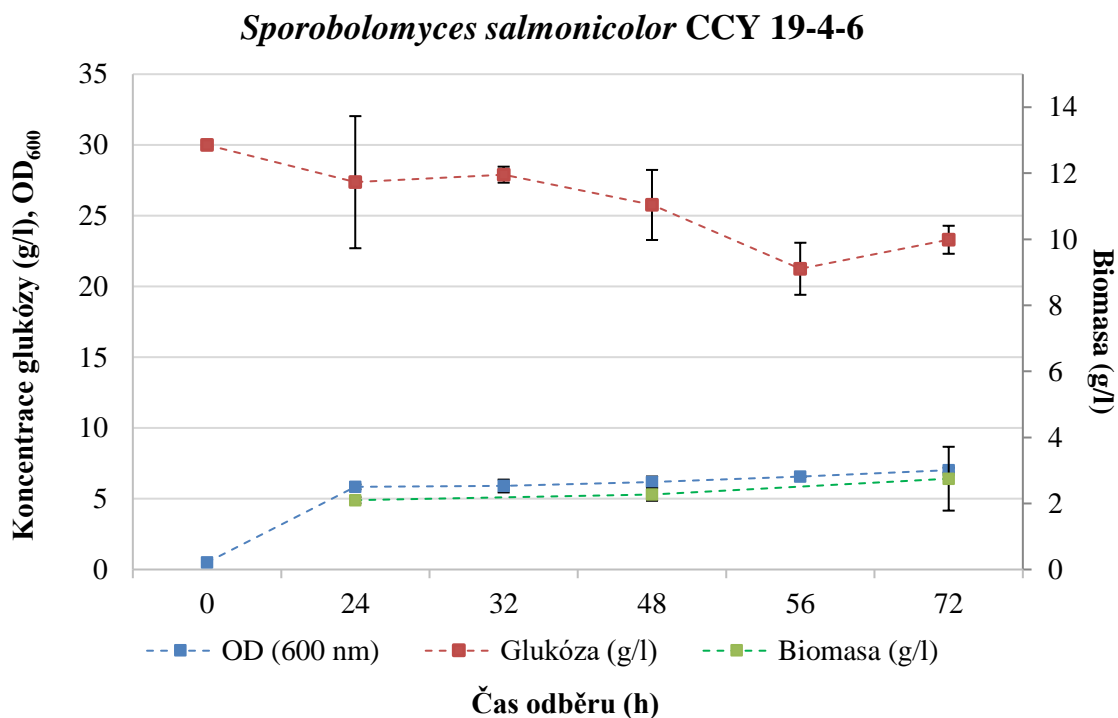


Graf 2: Růstová křivka stanovená z OD_{600} a biomasy a utilizace glukózy *R. glutinis* CCY 20-2-33.

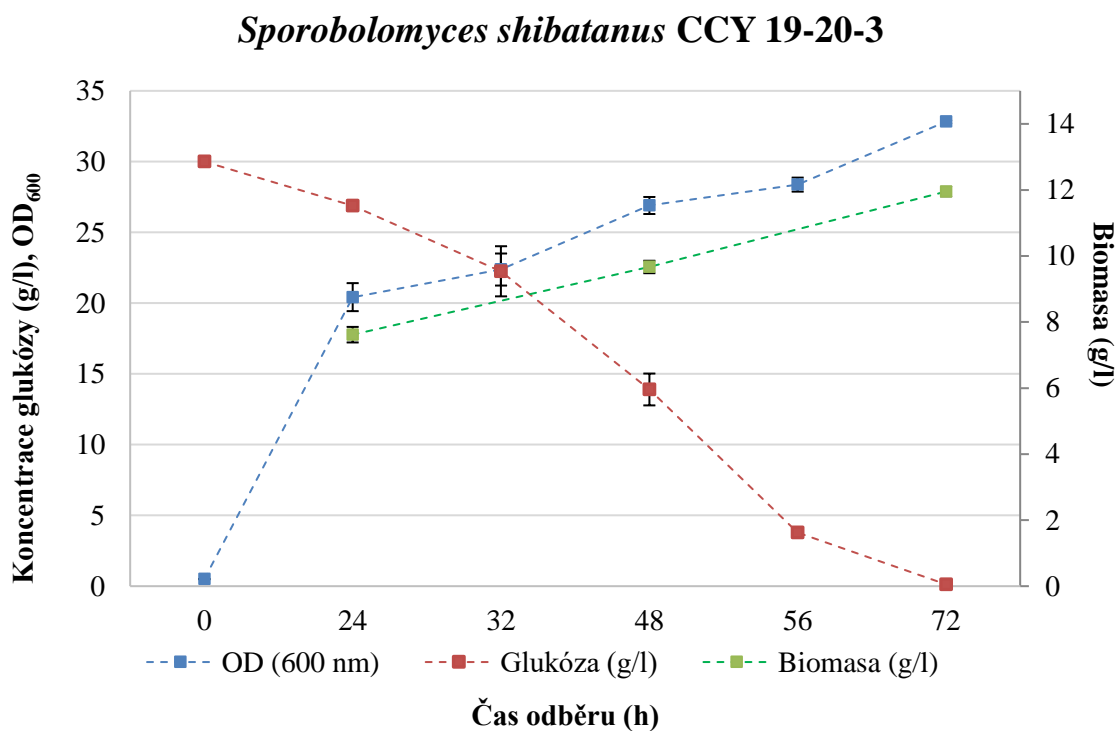
Rhodotorula glutinis CCY 20-2-26



Graf 3: Růstová křivka stanovená z OD_{600} a biomasy a utilizace glukózy *R. glutinis* CCY 20-2-26.

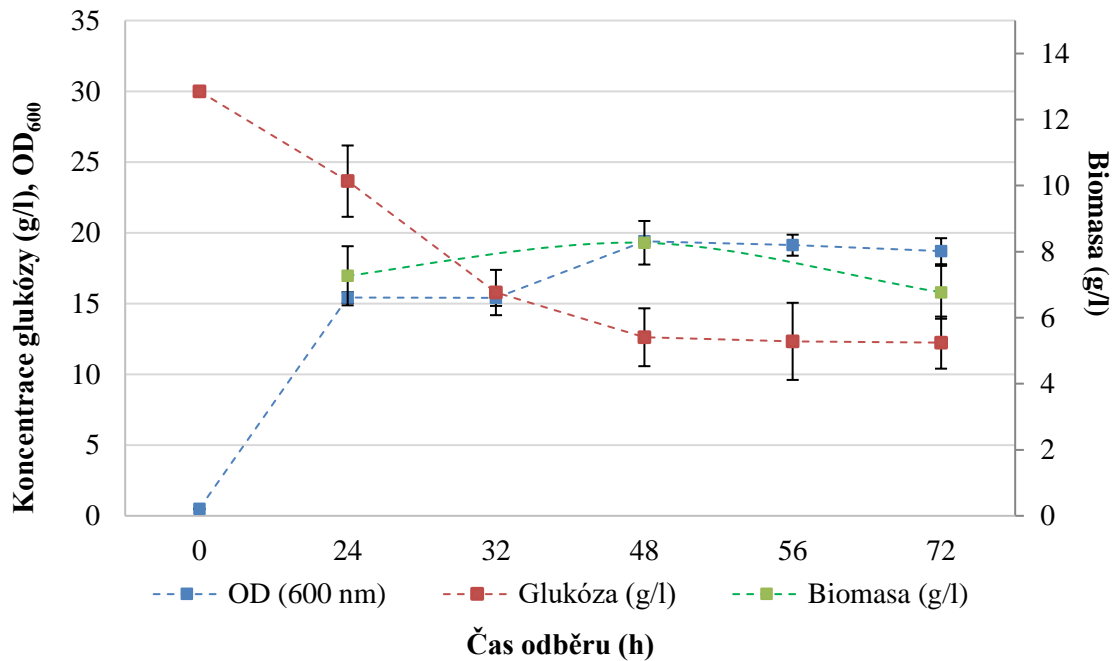


Graf 4: Růstová křivka stanovená z OD_{600} a biomasy a utilizace glukózy *S. salmonicolor* CCY 19-4-6.



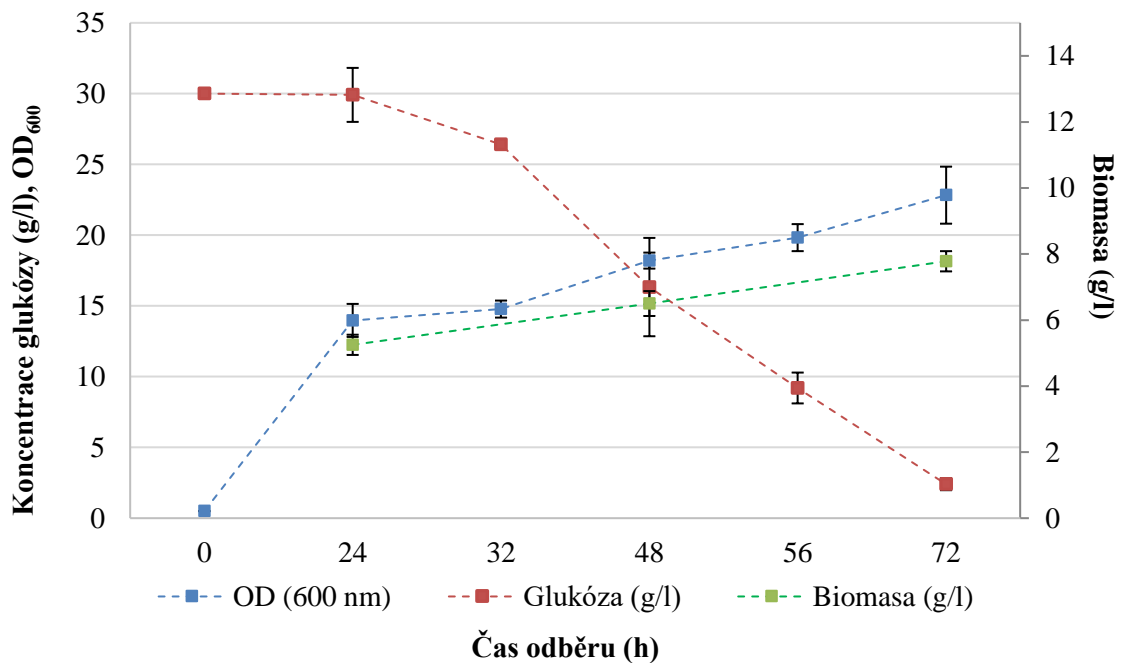
Graf 5: Růstová křivka stanovená z OD_{600} a biomasy a utilizace glukózy *S. shibatanus* CCY 19-20-3.

Sporobolomyces roseus CCY 19-6-4



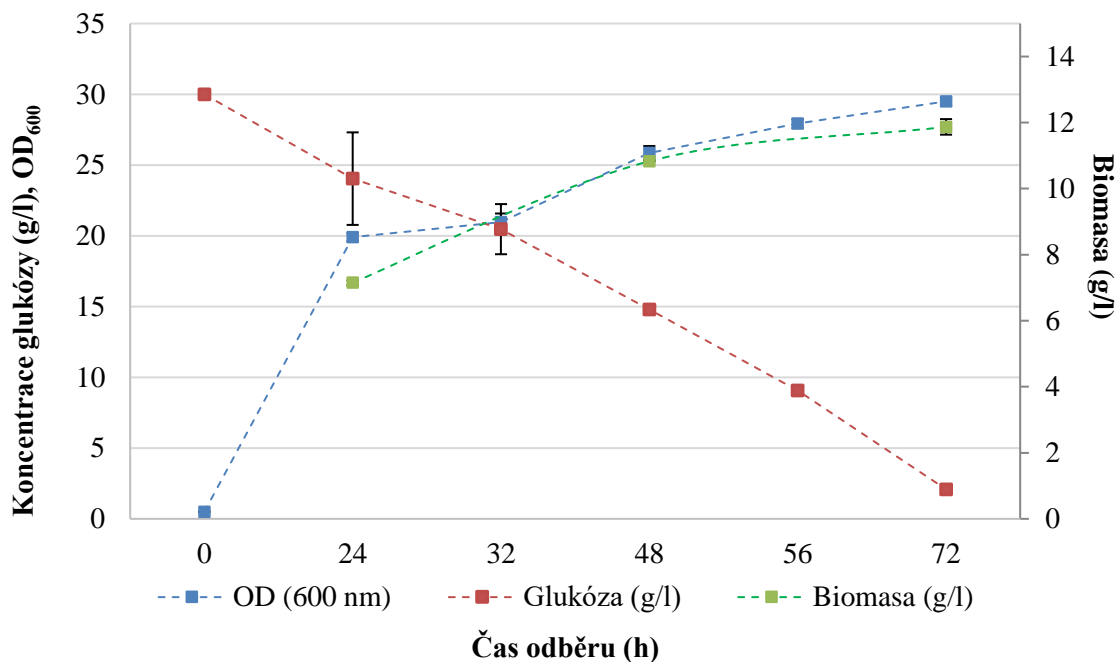
Graf 6: Růstová křivka stanovená z OD_{600} a biomasy a utilizace glukózy *S. roseus* CCY 19-6-4.

Rhodotorula toruloides CCY 20-7-28



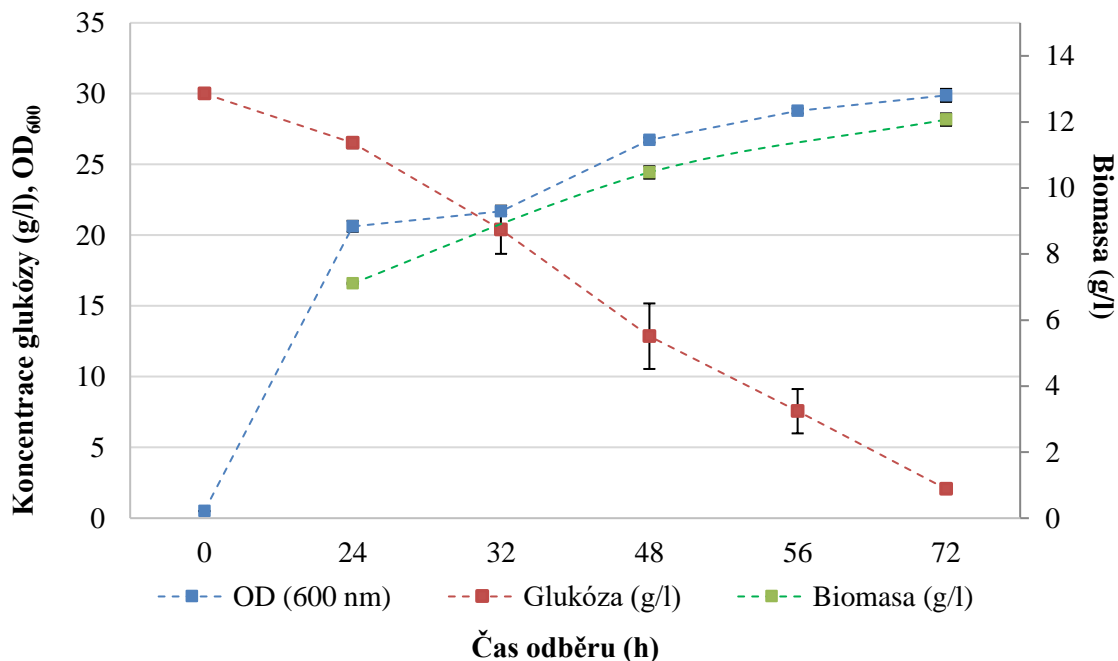
Graf 7: Růstová křivka stanovená z OD_{600} a biomasy a utilizace glukózy *R. toruloides* CCY 20-7-28.

Sporobolomyces pararoseus CCY 19-9-6



Graf 8: Růstová křivka stanovená z OD600 a biomasy a utilizace glukózy *S. pararoseus* CCY 19-9-6.

Sporobolomyces metaroseus CCY 19-6-20



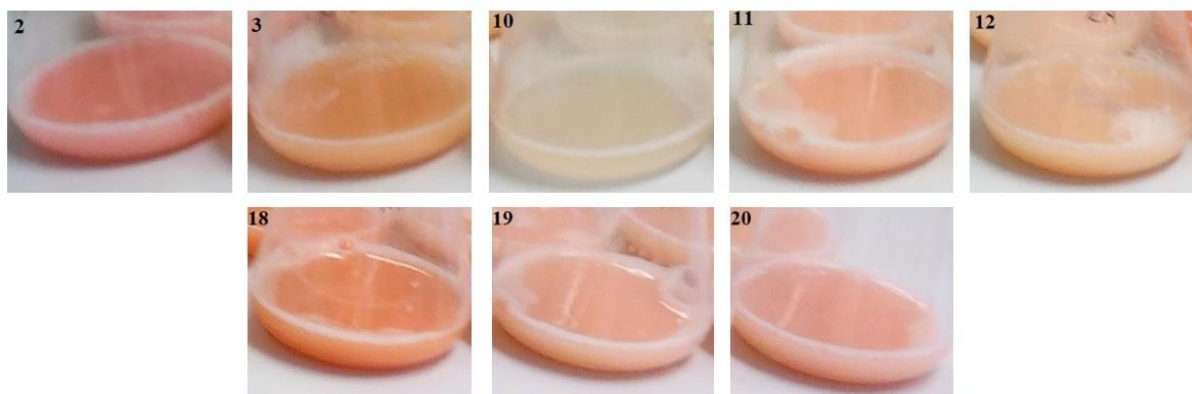
Graf 9: Růstová křivka stanovená z OD600 a biomasy a utilizace glukózy *S. metaroseus* CCY 19-6-20.

5.2.4 Produkce metabolitů

Karotenogenní kvasinky jsou charakteristické jejich schopností produkovat karotenoidní pigmenty jako je β -karoten, γ -karoten, astaxanthin, torulen či torularhodin, které způsobují

jejich žluté, oranžové a červené zbarvení (Obr. 23), a proto se nazývají červené (karotenogenní) kvasinky. Akumulace karotenoidů probíhá v povrchových strukturách buněk i v nepovrchových částech buňky (převážně se vyskytují v lipidových tělíčkách – „lipid bodies“). Dále jsou schopné akumulovat ergosterol, nenasycené mastné kyseliny, koenzymy Q10 i Q9 a další.

Zároveň s růstovými charakteristikami byly sledovány také produkční vlastnosti vybraných metabolitů. Produkce sekundárních metabolitů probíhá především ve stacionární fázi růstu kvasinek (viz kapitola 4.4.2.2).

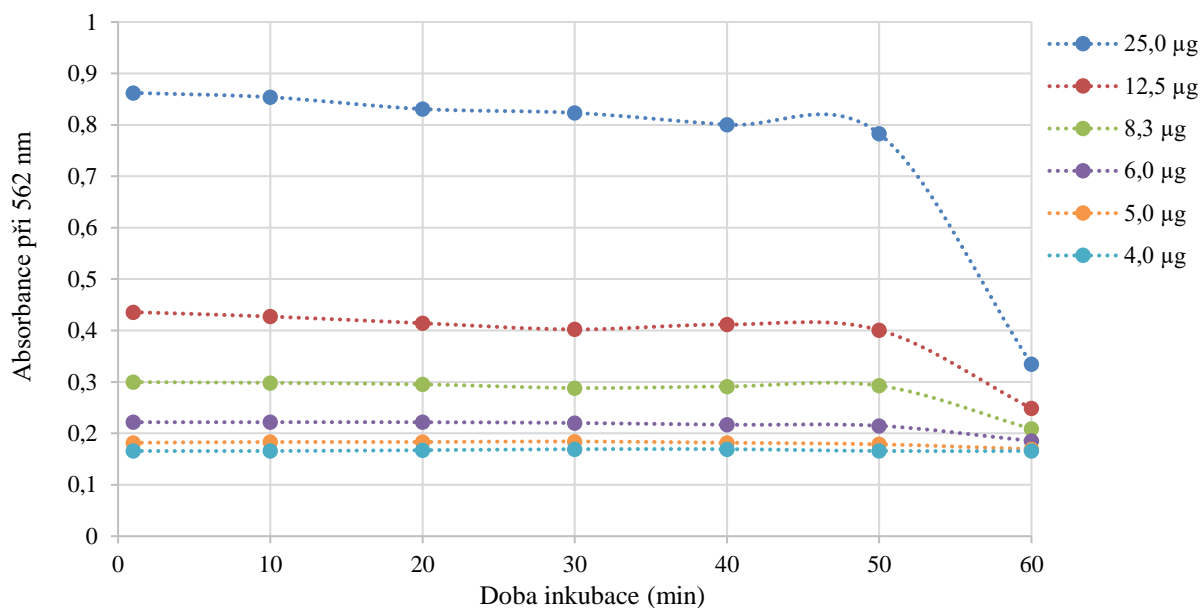


Obr. 23: Zbarvení karotenogenních kvasinek v produkčním médiu po 48 h kultivace. Označení kvasinek podle Tab. 1.

Kit Serum Triglyceride Determination slouží ke kvantitativnímu stanovení glycerolu, celkových triglyceridů nebo volných triglyceridů. Kit obsahuje také glycerolový standard. V příloženém protokolu je doporučeno inkubovat vzorky s reakční směsí při 37°C alespoň po dobu 15 minut, proto bylo provedeno kinetické měření na ELISA reader po dobu 60 minut a zároveň byl porovnán glycerolový standard (Obr. 12, Graf 10) s obsahem TAG v olivovém oleji (Graf 11).

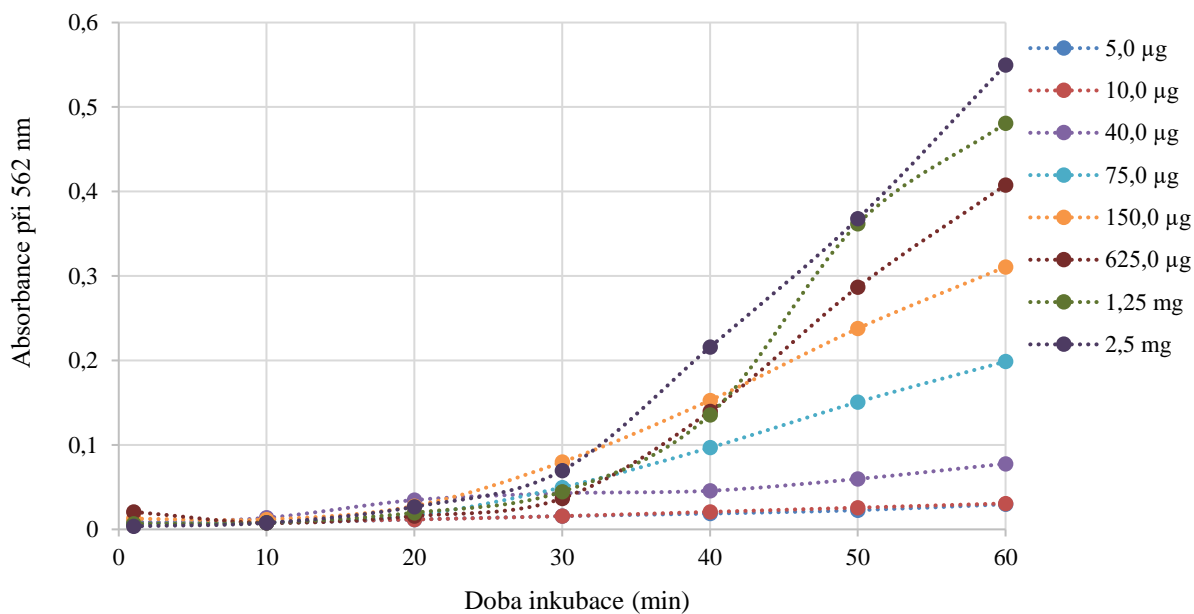
Z Graf 10 a Graf 11 je patné, že je důležité vybrat vhodnou dobu inkubace pro vzorky, jelikož musí proběhnout enzymatická reakce katalyzovaná lipasou, která štěpí TAG na glycerol a mastné kyseliny. Volný glycerol vykazuje nejvyšší relativní absorbanci už v první minutě měření, kdežto absorbance TAG vzorků začíná stoupat po dvacáté minutě a přeměna všech TAG není ukončena ani po hodinové inkubační době. Padesátá minuta inkubace byla zvolena pro odečet absorbancí vzorků a výpočet glycerolu ve vzorku. Obsah glycerolu ve vzorku byl vypočten z kalibrační křivky standardního glycerolu, kde koncentrace standardu 2,5 mg/ml odpovídá koncentraci trioleinu 0,26 mg/ml. Příklad kinetiky enzymatické reakce reálných vzorků v Graf 12.

Enzymatická kinetika glycerolového standardu

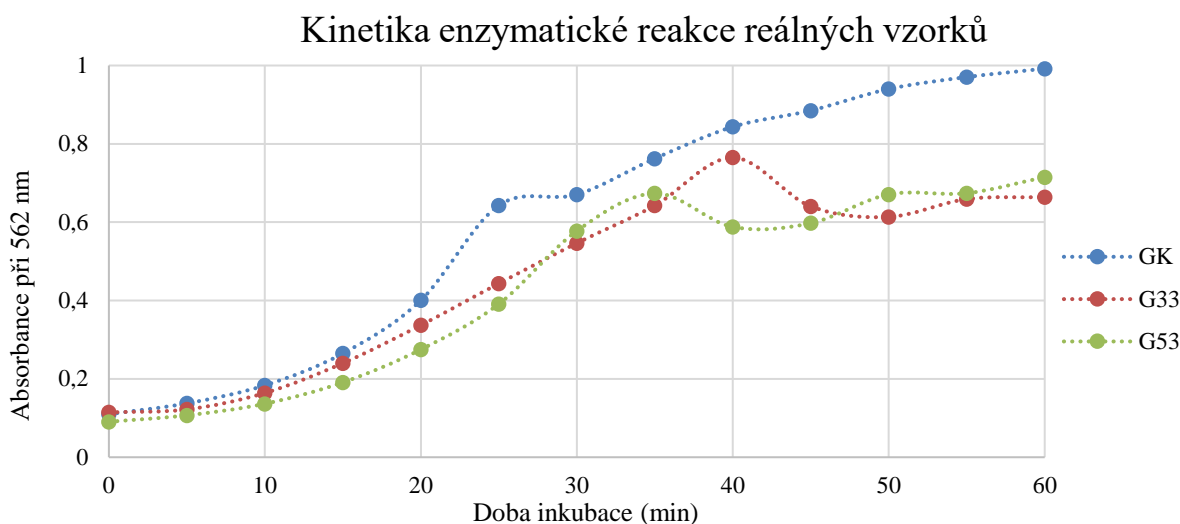


Graf 10: Kinetika enzymatické reakce glycerolového standardu stanovena při vlnové délce 562 nm.

Enzymatická reakce olivového oleje

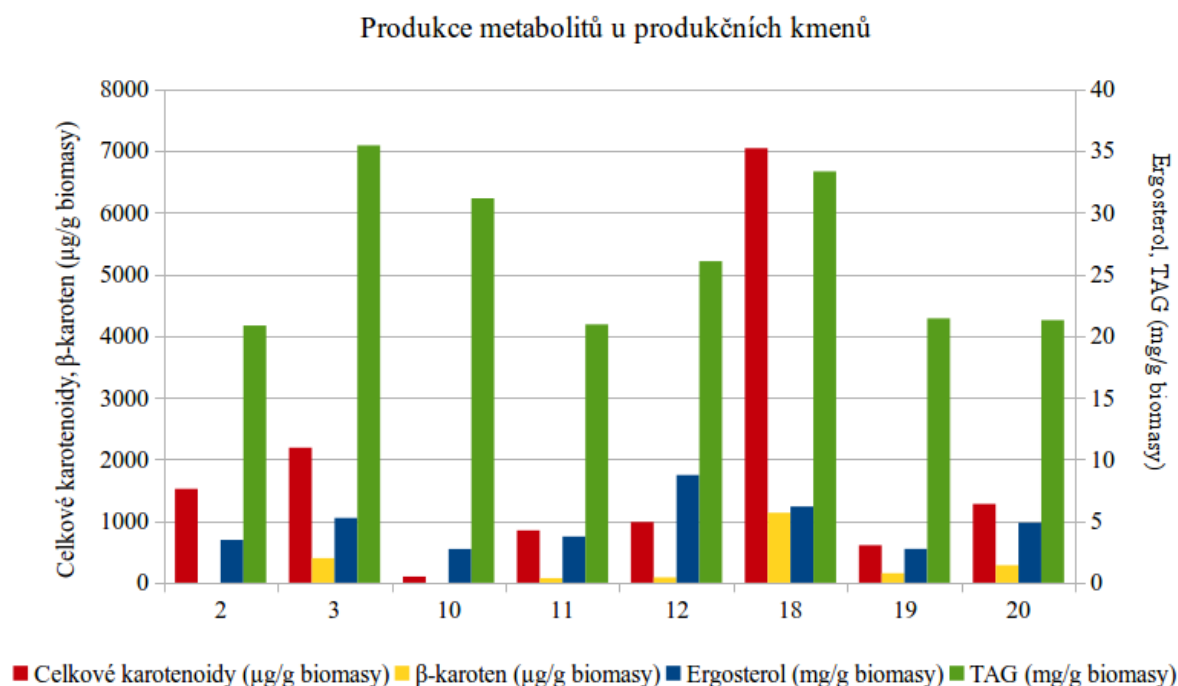


Graf 11: Kinetika enzymatické reakce standardu TAG z olivového oleje stanovena při vlnové délce 562 nm.



Graf 12: Kinetika enzymatické reakce reálných vzorků.

Nejlepším producentem TAG z osmi karotenogenních kvasinek je *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26 s obsahem 35,5 mg/g biomasy. Procentuální obsah lipidů v sušině této kvasinky je 3,5 %. Další dobrý producent je *R. toruloides* s produkcí 33,2 mg/g biomasy. Tato kvasinka byla na základě nejlepších produkcí všech metabolitů vybrána k mutagenезi. Dobrou produkci TAG na hmotnost suché biomasy vykávala kvasinka *S. salmonicolor* (31,1 mg/g biomasy), která má ale na druhou stranu podstatně nejnižší produkci karotenoidů a jednu z nejnižších produkcí ergosterolu (Graf 13).



Graf 13: Shrnutí produkce karotenoidů, ergosterolu a triacylglycerolů karotenogenními kvasinkami. Označení kvasinek podle Tab. 1.

K chromatografické analýze karotenoidů a ergosterolu byla použita soustava RP-HPLC/PDA. Analyzovaná data byla zpracovaná chromatografickým softwarem X Calibur.

Vzorky byly separovány na nepolární chromatografické koloně C18 Kinetex (viz kapitola 4.4.2.6).

Koncentrace celkových karotenoidů a β -karotenu byla vypočtena z kalibrační křivky vytvořené ze standardů β -karotenu. *R. toruloides* je nejlepším producentem celkových karotenoidů (7,04 mg/g biomasy) i β -karotenu (1,13 mg/g biomasy). Procentuální obsah karotenoidů v sušině této kvasinky je 0,69 %. Z charakteristických absorpčních maxim v chromatogramu pro tuto kvasinku byly identifikovány také karotenoidy torulen (459, 482, 514 nm) a torularhodin (459, 482, 524 nm). Trojpek β-karotenu má absorpční maxima při 425, 450 a 477 nm. Tyto tři karotenoidy jsou charakteristické pro rod *Rhodotorula*. Druhým nejlepším producentem je *R. glutinis* CCY 20-2-26 s produkcí celkových karotenoidů 2,19 mg/g biomasy a β -karotenu 398 μ g/g biomasy. Kvasinky *R. glutinis* CCY 20-2-33 a *S. salmonicolor* neprodukovaly žádný β -karoten (Graf 13). Z pozorování kultury produkčních médií (Obr. 233) lze usoudit, že *R. glutinis* CCY 20-2-33 pravděpodobně produkovala pouze torulen a torularhodin, protože zbarvení těchto karotenoidů je specificky růžové.

Koncentrace ergosterolu byla vypočtena z kalibrační křivky vytvořené ze standardů ergosterolu. Kvasinka *S. roseus* byla stanovena jako nejlepší producent ergosterolu, na jeden gram suché biomasy vyprodukovala 8,71 mg ergosterolu (0,85 % biomasy). *R. toruloides* jako druhý nejlepší producent ergosterolu nasyntetizoval 6,17 mg/g biomasy (Graf 13).

V součtu všech stanovených metabolitů se jeví jako nejlepší producent z osmi karotenogenních kvasinek *R. toruloides*, z toho důvodu byl tento druh vybrán pro náhodnou mutaci UV zářením s cílem charakterizace nejlepších produkčních mutantních kmenů ve srovnání s původními vlastnostmi.

5.3 Mutageneze

Fyzikální a chemické vlivy vnějšího prostředí, ale i vlastní metabolismus buňky, DNA neustále poškozují a dochází k náhodným mutacím. Mutagenezí mikrobiální DNA lze dosáhnout produkce metabolitů s vyšším výnosem, v našem případě biosyntézy karotenoidů a lipidů. Hojně používaným mutagenem je UV záření o vlnové délce 265 nm, jelikož zde DNA vykazuje nejvyšší absorpci. V této práci byl použit právě tento typ mutagenu. Mutantní kmeny byly adaptované na odpadní substrát syrovátku a glycerol. Aplikací odpadních substrátů lze zajistit snížení výrobních nákladů.

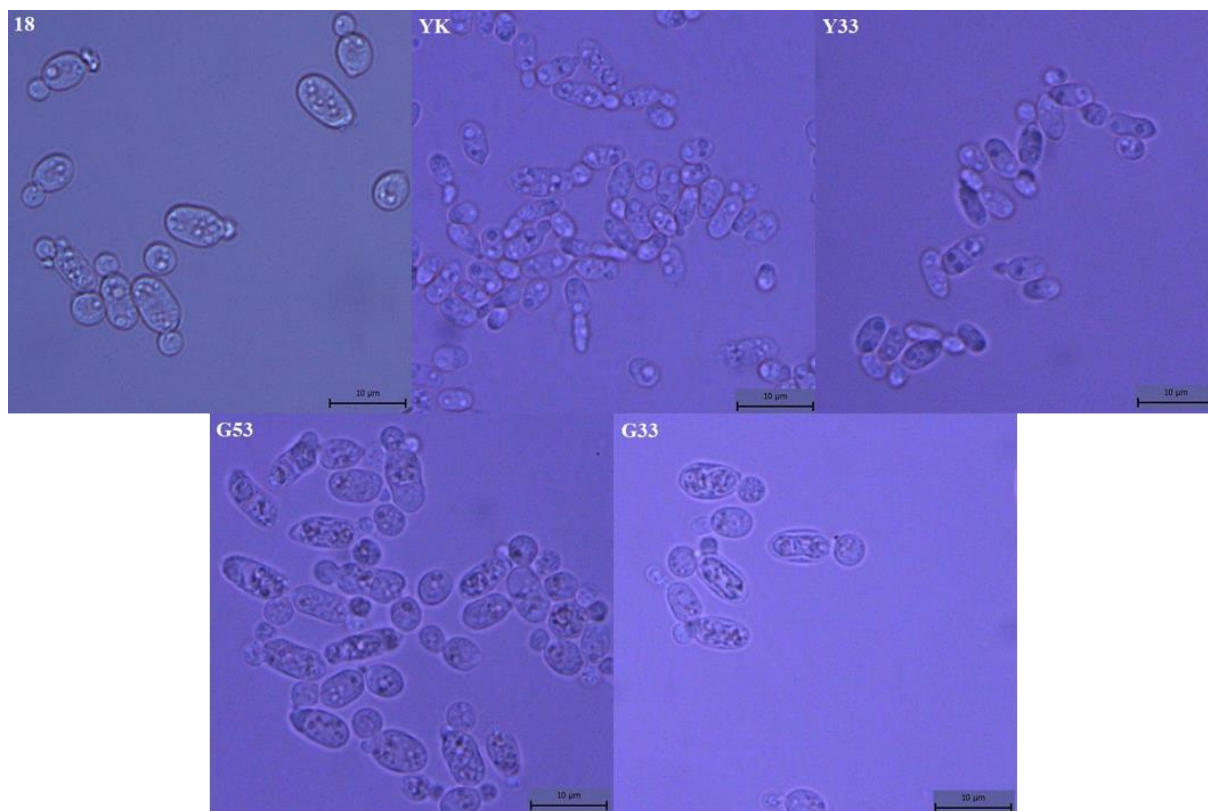
Posouzením produkčních vlastností mezi osmi vybranými druhy karotenogenních kvasinek byl vybrán nejlepší producent. Mezi srovnávanými metabolity byly celkové karotenoidy, β -karoten, ergosterol a triacylglyceroly a byly přepočítány na gram suché hmotnosti. Vybraným nejproduktivnějším druhem byla kvasinka *Rhodotorula toruloides*, která na gram suché biomasy vyprodukovala 7,04 μ g celkových karotenoidů, 1,13 μ g β -karotenu, 6,17 mg ergosterolu a 33,2 mg TAG.

Označení mutantní *R. toruloides* na substrátech glukóze (G), glycerolu (Y) a syrovátce (S) je následující: K v popisku znamená kontrolní nemutovaný kmen, první číslo za substrátem (G, Y, S) udává dobu osvětlení UV zářením a druhé číslo udává číslo vyselektované kolonie kvasinky.

5.3.1 Morfologické změny u mutantních kmenů

Morfologie se zabývá stavbou buněčné struktury organismů. Byla porovnána morfologie některých mutantních kmenů karotenogenních kvasinek a byla porovnána s nemutovaným druhem *R. toruloides*. Kvasinky byly mikroskopicky pozorovány po kultivaci na produkčním

médiu po 72 hodinách kultivace. Přirozené buňky *R. toruloides* kultivované na glukóze jsou kulaté až mírně oválné, buňky jsou většinou samostatně a tvoří shluky. Obsah buněk je členitý (heterogenní), což může být spojeno s výskytem lipidových tělísek, tzv. „lipid bodies“. Mutované kmeny a také nemutované kmeny na glycerolu mají protáhlejší tvar a také se více shlukují, což může být zapříčiněno stresem. Granularita buněk, a tedy množství lipidových tělísek, se oproti kontrole téměř nemění (Obr. 24).



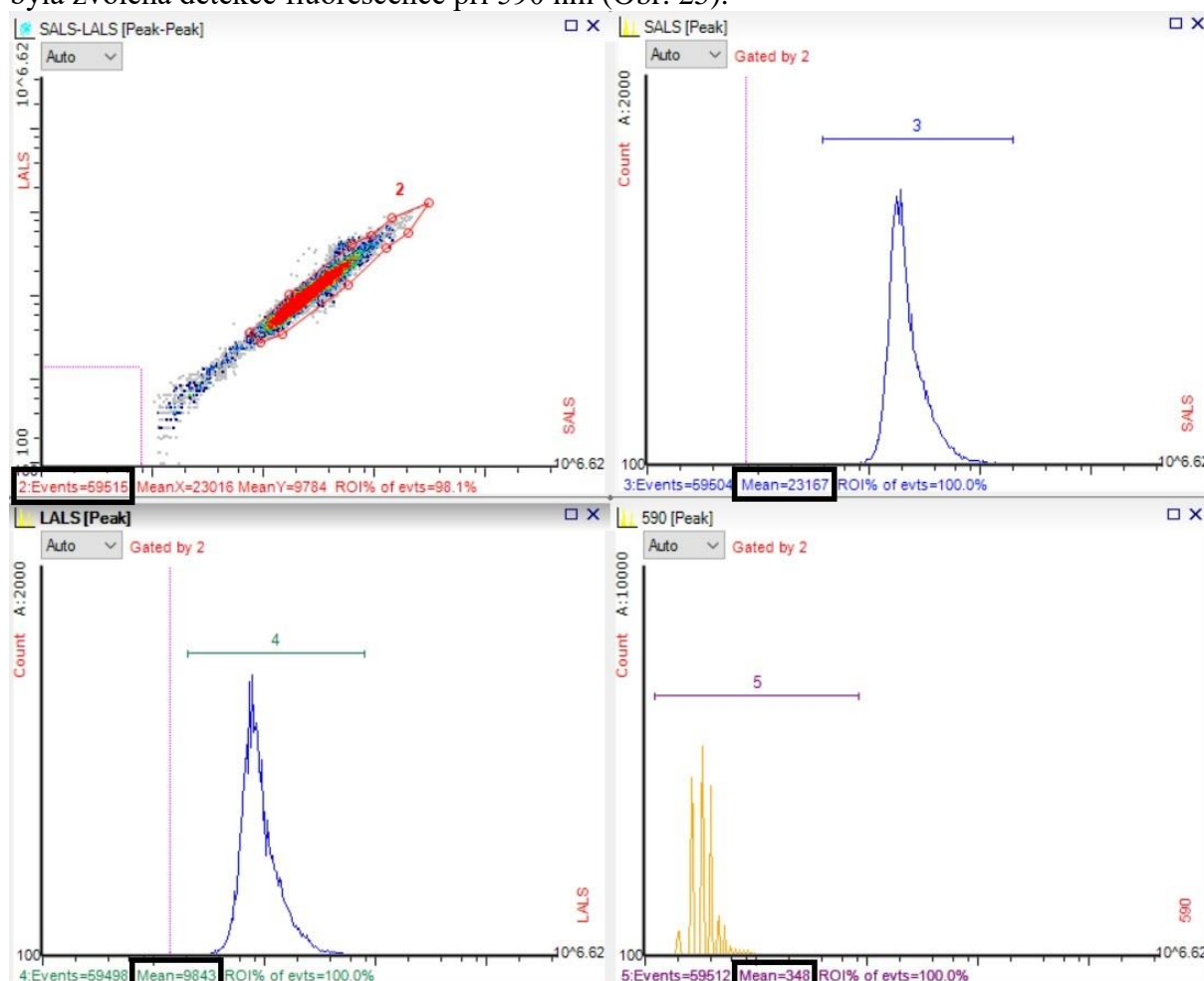
Obr. 24: Mikroskopie nemutované i mutované kvasinky *R. toruloides* na substrátech glukóze (G) a glycerolu (Y). 18 je přirozený druh *R. toruloides*. K v popisku znamená kontrolní nemutovaný kmen, první číslo za substrátem (G, Y) udává dobu osvětlení UV zářením a druhé číslo udává číslo vybrané kolonie kvasinky.

5.3.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie dokáže analyzovat mikrobiologické vzorky na úrovni buněk, tedy lze třídit jednotlivé buňky heterogenní směsi mikroorganismů na základě rozptylu přímého (SALS, small angle light scattering) i bočního světla (LALS, large angle light scattering). Pokud je buňka schopná přirozené fluorescence (tzv. autofluorescence) nebo je na ni navázané fluorescenční barvivo např. Nilská červeň, lze uplatnit metodu průtokové cytometrie k fluorescenčně-aktivovanému třídění buněk (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting). Velkou výhodou průtokové cytometrie je rychlost měření, díky tomuto faktu byly po krátké kultivaci mutantní kmeny *R. toruloides* vyselektovány v krátkém čase.

Vybranou metodou byl stanoven počet buněk, průměrná velikost buněk, granularita buněk a množství karotenoidů v arbitrárních jednotkách („arbitrary units“). Přímý rozptyl světla (detektor SALS) je úměrný velikosti buňky tedy jejímu objemu a boční rozptyl světla (detektor LALS) závisí na vnitřní členitosti buňky a do jisté míry i na hustotě buňky. Z hodnot

detektoru SALS a LALS je tedy možné vypočítat hmotnost jedné buňky. Karotenoidy obsahující konjugované dvojně vazby jsou schopné fluorescence v oblasti zeleného až žlutého spektra tedy 515-595 nm. Z důvodu překrývající se fluorescence s koenzymy v zelené oblasti byla zvolena detekce fluorescence při 590 nm (Obr. 25).



Obr. 25: Histogram z průtokového cytometru. V černých obdélnících jsou použité hodnoty pro výpočty potřebné k selekci mutantních kmenů *R. toruloides*.

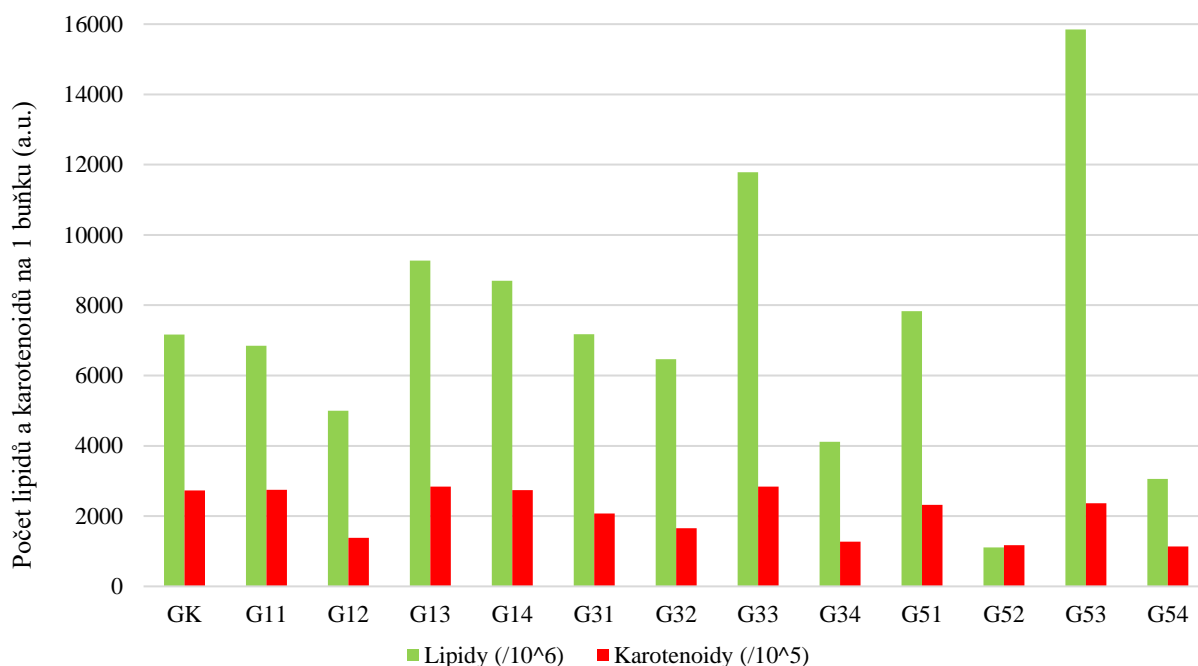
Ze získaných výsledků z průtokového cytometru byly vybrány dvě kolonie mutantních kmenů pro každý substrát k detailnější analýze metabolitů a porovnání produkčních vlastností nemutovaných a mutovaných kmenů. Pro daný substrát byla selekce mutantů realizována na základě součtu hodnot obsahu karotenoidů, stanovených z autofluorescence při 590 nm, a lipidů, stanovených z fluorescence nilské červeně vázané na lipidy. V potaz při selekci mutantů byla brána i členitost buněk. Tyto hodnoty byly přepočítány na jednu buňku.

Karotenoidy jsou v buňkách inkorporovány do membrán. Pokud se karotenoidy akumulují v membránách, je vztah mezi množstvím karotenoidů a fluorescencí lineární. Jakmile se začnou karotenoidy akumulovat do lipid bodies, tak závislost koncentrace karotenoidů na fluorescenci přestává být lineární, jelikož dochází opakovaně k reabsorpci a zaznamenaná fluorescence je pouze ta, která pochází z membrán. K reabsorpci dochází i u fluorescenci nilskou červení obarvených buněk. Proto jsou výsledky z průtokového cytometru pouze orientační a posloužily pouze k rychlé selekci pravděpodobně nejlepších mutantů [76].

Mutantní kmen na glukózovém médiu měl mnohem vyšší produkci lipidů než karotenoidů na buňku. Z Graf 14 lze usoudit, že po ozáření kvasinek po dobu jedné minuty došlo

k nejmenším změnám oproti nemutovanému kmenu. Se zvyšující se dobou ozáření UV zářením dochází k průměrnému poklesu biosyntézy karotenoidů. Nejlepšími mutantními kmeny produkujícími lipidy jsou G33 a G53 a největší produkce karotenoidů dosáhly kmeny G13 a G33 se stejným množstvím karotenoidů na buňku. Celkově nejlepším producentem je tedy kmen mutovaný UV zářením po dobu 3 minut a jako další kmen pro celkovou kultivaci a stanovení produkčních vlastností byl vybrán G53 s vysokým množstvím karotenoidů na buňku.

Mutantní *R. toruloides* kultivovaná na glukóze

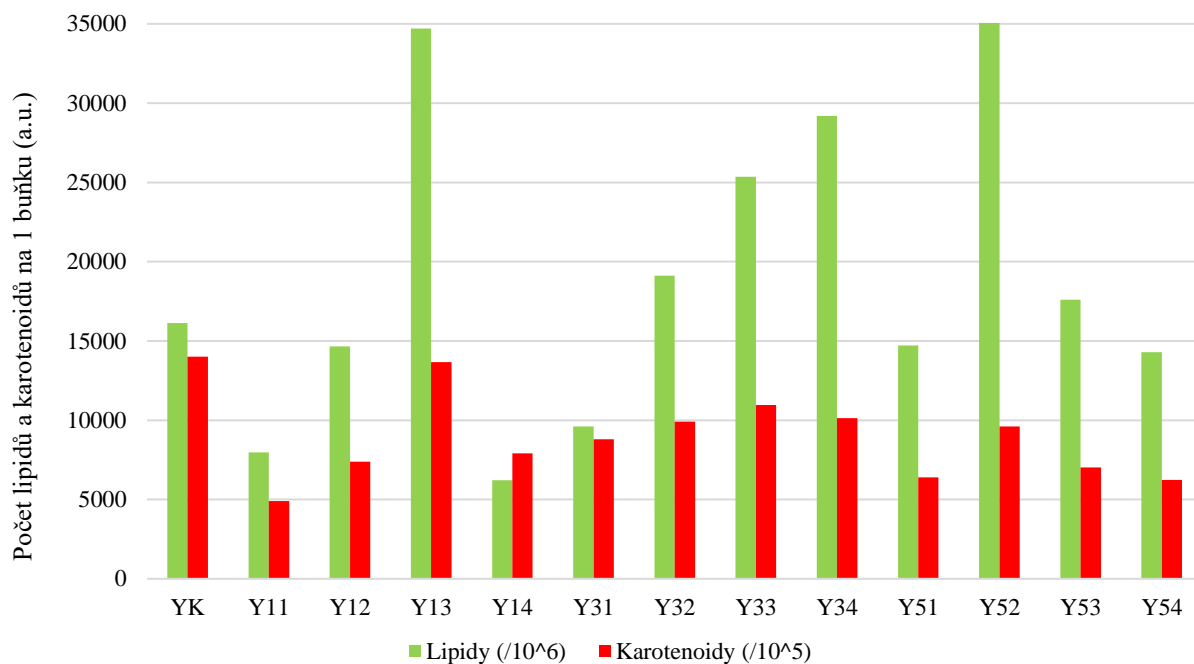


Graf 14: Relativní množství karotenoidů a lipidů vztahovaných na jednu buňku produkovaných mutantním kmenem. K v popisku znamená kontrolní nemutovaný kmen, první číslo za substrátem (G) udává dobu osvětlení UV zářením a druhé číslo udává číslo vybrané kolonie kvasinky.

Mutantní kmen na glycerolovém médiu vykazuje i dvojnásobně vyšší hodnoty značící obsah lipidů a až čtyřnásobně vyšší hodnoty karotenoidů na buňku oproti kmenům kultivovaným na glukóze. Nejvíce lipidů obsahuje kmen Y13 a Y52 a nejvíce karotenoidů kmen Y13 a Y34. Vybrané mutantní kmeny pro stanovení nadprodukčních vlastností byly Y13 a Y34 (Graf 15).

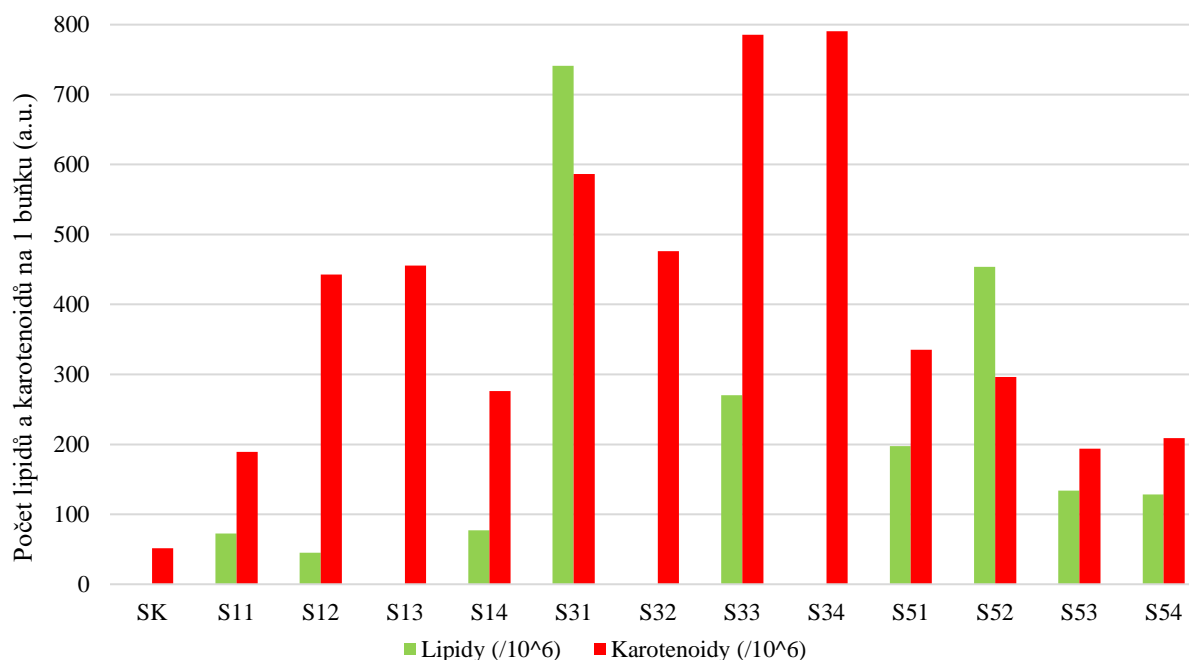
Mutantní kmeny adaptované na syrovátce mají podstatně menší produkci lipidů a produkce karotenoidů je srovnatelná s produkcí karotenoidů na glycerolu. Nemutovaný kmen není schopný využít syrovátku a produkce metabolitů, jak je zřejmé z Graf 16, což je potvrzeno metodou „drop“ test (viz kapitola 5.2.1). Až teprve po ozáření UV světlem byly mutované kmeny schopné vyšší produkce karotenoidů a částečně i lipidů. Nejvíce lipidů obsahuje kmen S31 a S52 a nejvíce karotenoidů kmen S33 a S34. Vybrané kmeny pro stanovení nadprodukčních vlastností byly S31 a S33 (Graf 16).

Mutantní *R. toruloides* kultivovaná na glycerolu



Graf 15: Relativní množství karotenoidů a lipidů vztahených na jednu buňku produkovaných mutantním kmenem. K v popisku znamená kontrolní nemutovaný kmen, první číslo za substrátem (Y) udává dobu osvětlení UV zářením a druhé číslo udává číslo vybrané kolonie kvasinky.

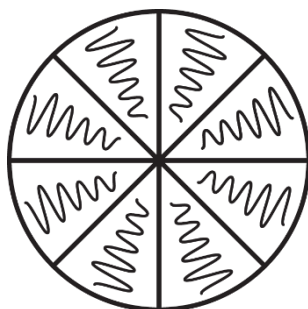
Mutantní *R. toruloides* kultivovaná na syrovátce



Graf 16: Relativní množství karotenoidů a lipidů vztahených na jednu buňku produkovaných mutantním kmenem. K v popisku znamená kontrolní nemutovaný kmen, první číslo za substrátem (S) udává dobu osvětlení UV zářením a druhé číslo udává číslo vybrané kolonie kvasinky.

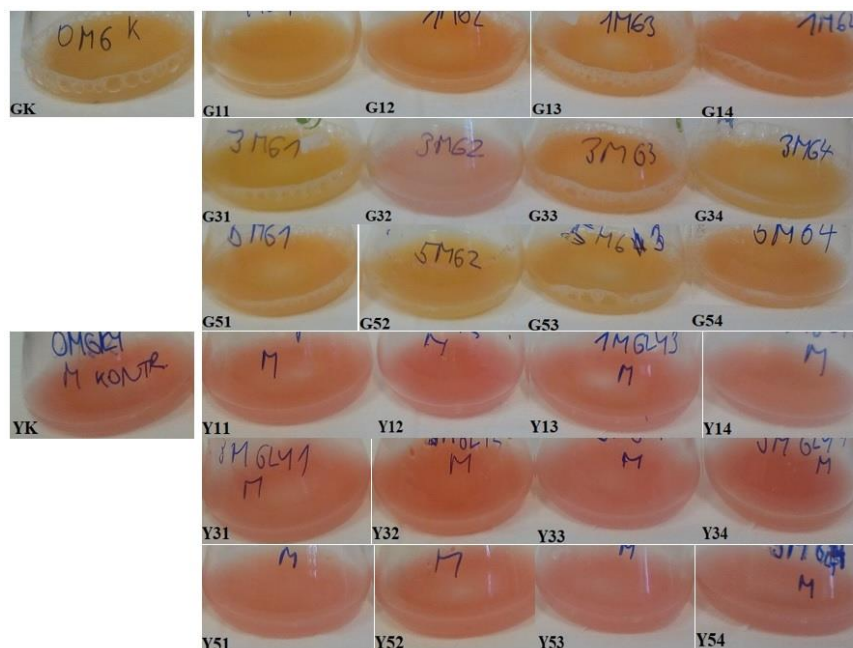
5.3.3 Kultivace mutantních kmenů ve větším objemu

Po kultivaci mutantních kmenů na tuhém substrátu s glukózou, odpadní syrovátkou a glycerolu bylo vybráno osm kolonií, z toho čtyři nejsvětlejší a čtyři nejintenzivněji zbarvené, které byly rozetřeny na Petriho misku podle Obr. 26. Po 72 hodinách růstu samostatných kolonií byly dále pro selekci vybrány čtyři kolonie, dvě nejsvětlejší a dvě nejintenzivněji zbarvené, které byly podrobeny krátké kultivaci a selekci nejlepších producentů po vyhodnocení dat získaných z průtokového cytometru.



Obr. 26: Znárodnění rozetru osmi kolonií na Petriho misku s YPD médiem. Jedna miska odpovídá určitému substrátu a době ozáření.

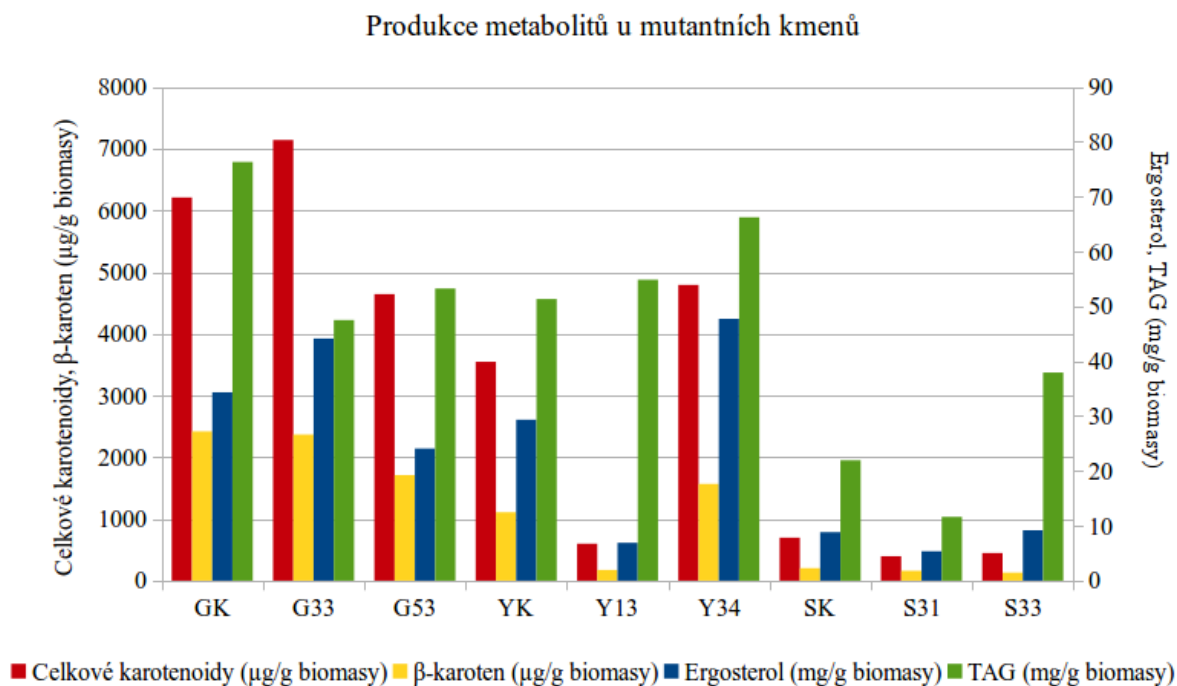
Na Obr. 27 pozorujeme odlišné zbarvení vybraných kolonií mutantních kmenů na mezi glukózovými a glycerolovými produkčními médii. Všechna glycerolová média jsou zbarvena růžově s malými rozdíly v odstínech. Glukózová média jsou všechna kromě G32 zbarvena oranžově s výraznými rozdíly v odstínech. Kmen G32 je světle růžový, což mohlo zapříčinit největší zásah do integrity genomu, tento fakt by mohla potvrdit či vyvrátit metoda DGGE či sekvenace genů kódující proteiny regulující biosyntézu karotenoidů, změna barvy totiž orientačně udává množství určitých karotenoidů, například β -karoten je zbarven žlutočerveně.



Obr. 27: Zbarvení mutantních kmenů *R. toruloides* po 72 h kultivace na glukóze (G) a glycerolu (Y). K v popisku znamená kontrolní nemutovaný kmen, první číslo za substrátem (G, Y) udává dobu osvětlení UV zářením a druhé číslo udává číslo vybrané kolonie kvasinky.

Syrovátková média do obrázku zahrnuta nebyla, jelikož z důvodu přípravy syrovátky se všechny tyto média jevila stejným zabarvením. Syrovátková média o obsahu laktózy 30 g/l byla sterilována v autoklávu při 130°C s cílem usmrcení spor bakterií a tak zabránění případné kontaminaci. Dalším záměrem použití této vysoké teploty byla hydrolýza disacharidu laktózy na glukózu a galaktózu z důvodu zajištění vhodného substrátu, jelikož bylo metodou „drop“ test zjištěno, že karotenogenní kvasinky laktózu neutilizují.

S ohledem na orientační charakter výsledků průtokové cytometrie byly vybrané mutantní kmeny analyzovány i chromatograficky za účelem kvantifikace produkovaných metabolitů (viz kapitola 4.4.3). Z Graf 17 je patrné, že glukóza je nejvhodnějším substrátem i pro mutantní kmeny. G33 je lepším producentem celkových karotenoidů a ergosterolu oproti kontrole s produkcí 7,14 mg/g biomasy karotenoidů a 44,13 mg/g biomasy. Vyšší produkci ergosterolu prokázal také kmen Y34, množství ergosterolu činí 47,72 mg/g biomasy. Žádný mutantní kmen nedokázal syntetizovat více β -karotenu ani TAG oproti kontrole. Z Graf 17 se jeví být nejvhodnější doba ozáření UV zářením 3 minuty pro glukózové i glycerolové substráty. Produkce na syrovátkovém médiu byly několikanásobně menší oproti kontrole.

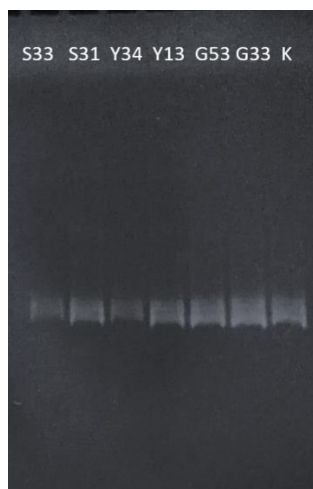


Graf 17: Shrnutí produkce karotenoidů, ergosterolu a triacylglycerolů mutantní R. toruloides. K v popisku znamená kontrolní nemutovaný kmen, první číslo za substrátem (G, Y, S) udává dobu osvětlení UV zářením a druhé číslo udává číslo vybrané kolonie kvasinky.

5.3.4 Stabilita genomu mutantních kmenů – DGGE

Po vyhodnocení analýzy oblastí ITS1, 5,8S-ITS2 a D1/D2 ribozomální DNA nemutovaných karotenogenních kvasinek byla vybrána jedna vysoce variabilní oblast – oblast 5,8S-ITS2, která byla po amplifikaci denaturována v akrylamidovém gelu s 50–80 % denaturanty DNA formamidem a močovinou. Tento úsek DNA je z výše jmenovaných nejdelší, je tedy nejvyšší pravděpodobnost, že bude také nejvíce variabilní. Tuto skutečnost potvrzuje i publikace Leawa *et al.* (2006), kde z 373 testovaných druhů kvasinek pouze jeden druh *Rhodotorula glutinis*

nebylo možné identifikovat analýzou sekvence ITS2 regionu. Tato data naznačují, že ITS2 sekvence jsou více druhově specifické než ITS1 sekvence [35].



Obr. 28: Vizualizace DGGE 5,8S-ITS2 regionu rDNA mutantních kmenů R. toruloides. K v popisku znamená kontrolní nemutovaný kmen, první číslo za substrátem (G, Y, S) udává dobu osvětlení UV zářením a druhé číslo udává číslo vybrané kolonie kvasinky.

DGGE je vhodná metoda k vyhledávání mutací genů a v případě rozdílu v jediném páru bází by došlo na akrylamidovém gelu v určitém denaturačním rozmezí k oddělení více rozdílných sekvencí DNA. Vzhledem ke skutečnosti, že ribozomální DNA je v genomu karotenogenních kvasinek v mnoha kopiích, lze usoudit, že nedošlo ke změně v sekvenci 5,8S-ITS2, jelikož by DNA na gelu jevila více zón a navíc se mutantní kmeny se oproti kontrole neliší (Obr. 28).

6 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce byla zaměřena především na molekulární charakterizaci a identifikaci osmi druhů karotenogenních kvasinek, které se vyznačují produkcí sekundárních metabolitů karotenoidů. Mezi vybrané druhy kvasinek patřily *R. glutinis* CCY 20-2-33, *R. glutinis* CCY 20-2-26, *R. toruloides* CCY 20-7-28, *S. salmonicolor* CCY 19-4-6, *S. shibatanus* CCY 19-20-3, *S. roseus* CCY 19-6-4, *S. pararoseus* CCY 19-9-6 a *S. metaroseus* CCY 19-6-20 a ty byly identifikovány molekulárními technikami za použití polymerázové řetězové reakce, denaturační gradientové gelové elektroforézy a sekvenací části jejich DNA. Cílenou oblastí pro identifikaci kvasinek byla oblast ITS1, 5,8S-ITS2 a region velké ribozomální podjednotky (26S) rDNA D1/D2. Tato dlouhá oblast rDNA se vyznačuje vysokou variabilitou v sekvenci a proto je často amplifikována s cílem identifikace mikroorganismů. Získaná sekvence dlouhé oblasti DNA kódující rDNA ve formátu FASTA byla vyhodnocena pomocí algoritmu BLAST a porovnána s databází NCBI. 5 druhů karotenogenních kvasinek bylo identifikováno jako *Rhodotorula mucilaginosa*, další tři kvasinky byly *R. glutinis*, *R. toruloides* a *S. roseus*. Identifikace byla potvrzena také metodou DGGE, kde v polyakrylamidovém gelu byly vidět čtyři různé úrovně profily denaturace DNA. Gelovou elektroforézou byla zjištěna velikost jednotlivých oblastí DNA, a to ITS1 250 bp, 5,8S-ITS2 450 bp a D1/D2 280 bp. DGGE bylo provedeno pro každou oblast variabilní DNA zvlášť, jelikož je metoda omezena do velikosti 500 bp.

Dalším cílem této práce bylo vybrat nejlepšího producenta karotenoidů, triacylglycerolů a ergosterolu, jímž byla prokázána karotenogenní kvasinka *R. toruloides* s produkcí celkových karotenoidů 6,21 mg/g biomasy, β -karotenu 2,42 mg/g, TAG 76,32 mg/g a ergosterolu 34,33 mg/g. Tento druh byl podroben náhodné mutagenézi UV ozářením po dobu 1, 3 a 5 minut s cílem dále zvýšit produkci metabolitů. Mutantní kmeny byly zároveň adaptovány na substráty glycerol a odpadní syrovátku. V první fázi byla provedena selekce mutantních kmenů *R. toruloides* po krátké kultivaci a po orientačním vyhodnocení relativního množství karotenoidů a lipidů pomocí průtokové cytometrie. Bylo vybráno šest mutantních kmenů, dva nejlepší od každého substrátu. Mutantní kmen G33, který byl ozářen po dobu 3 minut a kultivován na glukóze, je nejlepším producentem celkových karotenoidů s produkcí 7,14 mg/g biomasy. Nejvyšší produkci ergosterolu prokázal mutantní kmen Y34, který byl ozářen po dobu 3 minut a kultivován na glycerolu, množství produkovaného ergosterolu činí 47,72 mg/g biomasy. Žádný selektovaný mutantní kmen nedokázal syntetizovat více β karotenu ani TAG než divoký kmen *R. toruloides* kultivovaný na glukózovém médiu. Metodou DGGE nebyla prokázána žádná změna v sekvenci oblasti DNA 5,8S-ITS2 u mutantních kmenů.

K získání nadproducentů cílových metabolitů pomocí náhodné mutagenéze je potřeba analyzovat velké množství mutantních kmenů, což by přesáhlo rámec této práce. Je to však alternativní metoda k cílené genové manipulaci, která umožňuje selektovat produkční kmeny bez nutnosti umělého zásahu do genomu.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] International Commission on the Taxonomy of Fungi ICTF. *Fungal taxonomy* [online]. b.r. [cit. 2016-12-26]. Dostupné z: <http://www.fungaltaxonomy.org/>
- [2] BARTLETT, John M. S. a David STIRLING. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, 2003, s. 3 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1385/1-59259-384-4:3. ISBN 1592593844. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-384-4:3>
- [3] TAYLOR, John W. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* [online]. 2011, **2**(2), 113-120 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.5598/imafungus.2011.02.02.01. ISSN 22106340. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=2210-6340&volume=2&issue=2&spage=113>
- [4] WANG, Q.-M., M. GROENEWALD, M. TAKASHIMA, B. THEELEN, P.-J. HAN, X.-Z. LIU, T. BOEKHOUT a F.-Y. BAI Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within Pucciniomycotina determined from multigene sequence analyses. *Studies in Mycology* [online]. 2015, **81**, 27-53 [cit. 2016-12-26]. DOI: 10.1016/j.simyco.2015.08.002. ISSN 01660616. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166061615000147>
- [5] EDITED BY CLETUS P. KURTZMAN, a JACK W. FELL AND TEUN BOEKHOUT. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. ISBN 9780444521491.
- [6] HIBBETT, David, Manfred BINDER, Joseph BISCHOFF et al.. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* [online]. 2007, **111**(5), 509-547 [cit. 2016-12-26]. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.03.004. ISSN 09537562. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756207000615>
- [7] WANG, Q.-M., A.M. YURKOV, M. GÖKER et al. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. *Studies in Mycology* [online]. 2015, **81**, 149-189 [cit. 2016-12-26]. DOI: 10.1016/j.simyco.2015.12.002. ISSN 01660616. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166061615000287>
- [8] BOEKHOUT, Teun, Álvaro FONSECA, José SAMPAIO, Robert BANDONI, Jack FELL a Kyung KWON-CHUNG Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Basidiomycetous Yeasts. *The Yeasts* [online]. Elsevier, 2011, s. 1339 [cit. 2016-12-26]. DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00100-2. ISBN 9780444521491. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444521491001002>
- [9] Search on: Mycobank. *MYCOBANK DATABASE* [online]. b.r. [cit. 2017-01-21]. Dostupné z: http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=106492
- [10] ROSA, Carlos a GÁBOR PÉTER (EDS.). *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Berlin: Springer, 2006. ISBN 9783540309857.
- [11] MAROVA, Ivana, Milan CERTIK a Emilia BREIEROV. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. *Biomass - Detection, Production and Usage* [online]. InTech, 2011 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.5772/19235. ISBN 9789533074924. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biomass-detection->

production-and-usage/production-of-enriched-biomass-by-carotenogenic-yeasts-
application-of-whole-cell-yeast-biomass-to-pr

- [12] JIN, Jian-Ming, Jungkwan LEE a Yin-Won LEE. Characterization of carotenoid biosynthetic genes in the ascomycete *Gibberella zeae*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2010, **302**(2), 197-202 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01854.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2009.01854.x>
- [13] KOT, Anna M., Stanisław BŁAŻEJAK, Agnieszka KURCZ, Iwona GIENKA a Marek KIELISZEK. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, **100**(14), 6103-6117 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7611-8>
- [14] MÁROVÁ, Ivana, Andrea HÁRONÍKOVÁ, Siniša PETRIK, Emilie BREIEROVÁ a Terezie DVOŘÁKOVÁ. PRODUCTION OF ENRICHED BIOMASS BY RED YEASTS OF *SPOROBOLOMYCES* SP. GROWN ON WASTE SUBSTRATES. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. itra, Slovakia: Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Science, 2012, **1**(4), 534-551. ISSN 1338-5178.
- [15] GOORDIAL, Jacqueline, Isabelle RAYMOND-BOUCHARD, Robert RILEY et al.. Improved High-Quality Draft Genome Sequence of the Eurypsychrophile *Rhodotorula* sp. JG1b, Isolated from Permafrost in the Hyperarid Upper-Elevation McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Genome Announcements* [online]. 2016, **4**(2), 00069-16 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1128/genomeA.00069-16. Dostupné z: <http://genomea.asm.org/content/4/2/e00069-16.full>
- [16] MARGESIN, Rosa, Pierre-Alain FONTEYNE, Franz SCHINNER a José Paulo SAMPAIO. *Rhodotorula psychrophila* sp. nov., *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov. and *Rhodotorula glacialis* sp. nov., novel psychrophilic basidiomycetous yeast species isolated from alpine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2007, **57**, 2179–2184 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1099/ijs.0.65111-0. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.65111-0#tab2>
- [17] KUMAR, Shailesh, Hariom KUSHWAHA, Anand Kumar BACHHAWAT a Gajendra Pal Singh RAGHAVA. Genome Sequence of the Oleaginous Red Yeast *Rhodospiridium toruloides* MTCC 457. *Eukaryotic Cell* [online]. 2012, **11**(8), 1083-1084 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1128/EC.00156-12. Dostupné z: <http://ec.asm.org/content/11/8/1083.long>
- [18] TUON, Felipe F. a Silvia F. COSTA *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Revista Iberoamericana de Micología* [online]. 2008, **3**(25), 135-140 [cit. 2016-12-30]. ISSN 1130-1406. Dostupné z: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2707802>
- [19] MACGILLIVRAY, A. Ronald a Michael P. SHIARIS Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1993, **59**(5), 1613-1618 [cit. 2017-01-23]. DOI:

0099-2240/93/051613-06\$02.00/0.

Dostupné

z:

<http://aem.asm.org/content/59/5/1613.long>

- [20] PAUL, Debarati, Zenaida MAGBANUA, Mark ARICK, II, Todd FRENCH, Susan M. BRIDGES, Shane C. BURGESS a Mark L. Lawrence LAWRENCE. Genome Sequence of the Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* ATCC 204091. *Genome Announcements* [online]. 2014, **2**(1), 00046-14 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1128/genomeA.00046-14. Dostupné z: <http://genomea.asm.org/content/2/1/e00046-14>
- [21] G. S. DE HOOG ..., . *Atlas of clinical fungi*. 2. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures [u.a.], 2000. ISBN 9789070351434.
- [22] MATA-GÓMEZ, Luis, Julio MONTAÑEZ, Alejandro MÉNDEZ-ZAVALA a Cristóbal AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, **13**(1), 12- [cit. 2017-01-01]. DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 14752859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-12>
- [23] DU, Chao, Yingchao LI, Yahui GUO, Mei HAN, Weiguo ZHANG a He QIAN. The suppression of torulene and torularhodin treatment on the growth of PC-3 xenograft prostate tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2016, **469**(4), 1146-1152 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.12.112. ISSN 0006291x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X15311177>
- [24] GU, WL, GH AN a EA JOHNSON. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 1997, **19**(2), 114–117 [cit. 2017-01-01]. DOI: 10.1038/sj.jim.2900425. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1038/sj.jim.2900425>
- [25] BAGY, Magdy Mohamed Khalil, Mohamed Hemida ABD-ALLA, Nivien Allam NAFADY, Fatthy Mohamed MORSY a Ghada Abd-Elmonsef MAHMOUD. Bioconversion of plant wastes to β -carotene by *Rhodotorula glutinis* KU550702. *European Journal of Biological Research* [online]. 2016, **10**(4), 226-241 [cit. 2017-03-16]. DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.163649>. ISSN 2449-8955. Dostupné z: <http://www.journals.tmkarpinski.com/index.php/ejbr/article/view/492/248>
- [26] DUPONT, Sebastien, Guillaume LEMETAIS, Thierry FERREIRA, Philippe CAYOT, Patrick GERVAIS a Laurent BENEY. ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS: A FUNGAL PATHWAY FOR LIFE ON LAND?. *Evolution* [online]. 2012, **66**(9), 2961-2968 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x. ISSN 00143820. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x>
- [27] KURANDA, Klaudia, Kariona GRABINSKA, Thierry BERGES, Francis KARST, Veronique LEBERRE, Serguei SOKOL, Jean FRANÇOIS a Grazyna PALAMARCZYK. The YTA7 gene is involved in the regulation of the isoprenoid pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* [online]. 2009, **9**(3), 381-390 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00485.x. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2009.00485.x>
- [28] MARTÍNEZ, Elia, Vijaya RAGHAVAN, Fernando GONZÁLEZ-ANDRÉS a Xiomar GÓMEZ. New Biofuel Alternatives: Integrating Waste Management and Single Cell Oil

- Production. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, **16**(5), 9385-9405 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.3390/ijms16059385. ISSN 14220067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/5/9385/>
- [29] BLAZECK, John, Andrew HILL, Leqian LIU, Rebecca KNIGHT, Jarrett MILLER, Anny PAN, Peter OTOUPAL a Hal ALPER Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. *Nature communications* **5**. 2014, (3131). DOI: 10.1038/ncomms4131.
- [30] TEHLIVETS, Oksana, Kim SCHEURINGER a Sepp D. KOHLWEIN Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2007, **1771**(3), 255-270 [cit. 2017-01-14]. DOI: 10.1016/j.bbailip.2006.07.004. ISSN 13881981. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198106001995>
- [31] PLOIER, Birgit, Günther DAUM a Uroš PETROVIČ. Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism: Lipid Metabolism and Lipidomics. *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, s. 169 [cit. 2017-01-13]. DOI: 10.1007/978-3-642-55013-3_8. ISBN 9783642550126. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-55013-3_8
- [32] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 8021038411.
- [33] PINCUS, D. H., S. ORENGA a S. CHATELLIER Yeast identification – past, present, and future methods. *Medical Mycology* [online]. 2007, **45**(2), 97-121 [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1080/13693780601059936. ISSN 13693786. Dostupné z: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780601059936>
- [34] CIARDO, D. E., G. SCHAR, E. C. BOTTGER, M. ALTWEGG a P. P. BOSSHARD Internal Transcribed Spacer Sequencing versus Biochemical Profiling for Identification of Medically Important Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2006, **44**(1), 77-84 [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1128/JCM.44.1.77-84.2006. ISSN 00951137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.44.1.77-84.2006>
- [35] LEAW, S. N., H. C. CHANG, H. F. SUN, R. BARTON, J.-P. BOUCHARA a T. C. CHANG Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2006, **44**(3), 693-699 [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.1128/JCM.44.3.693-699.2006. ISSN 00951137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.44.3.693-699.2006>
- [36] GADANHO, Mário a José Paulo SAMPAIO. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula* : *Rh. glutinis sensu stricto* and *Rh. dairenensis* comb. nov. *FEMS Yeast Research* [online]. 2002, **2**(1), 47-58 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2002.tb00068.x. ISSN 15671356. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00068.x>
- [37] MITCHELL, Julian I. a Alga ZUCCARO. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* [online]. 2006, **20**(2), 62-74 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1016/j.mycol.2005.11.004. ISSN 0269915x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269915X05000042>

- [38] Nested polymerase chain reaction. *Wikipedia* [online]. b.r. [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Nested_polymerase_chain_reaction
- [39] FADDA, M.E., M.B. PISANO, L. SCACCABAROZZI, V. MOSSA, M. DEPLANO, P. MORONI, M. LICARDI a S. COSENTINO Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species isolated from bovine intramammary infection. *Journal of Dairy Science* [online]. 2013, **96**(12), 7692-7697 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.3168/jds.2013-6996. ISSN 00220302. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030213006905>
- [40] KOCHERGINSKAYA, Svetlana A., Isaac K.O. CANN a Roderick I. MACKIE Denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, s. 119 [cit. 2017-05-19]. DOI: 10.1007/1-4020-3791-0_9. ISBN 1402037902. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/1-4020-3791-0_9
- [41] DGGE. *WikiSkripta* [online]. b.r. [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/DGGE>
- [42] CANTOR, Charles R. a Cassandra L. SMITH. *Genomics: the science and technology behind the Human Genome Project*. New York: Wiley, 1999. ISBN 9780471599081.
- [43] SANGER, Frederick, S NICKLEN a AR COULSON. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [online]. 1997, **74**, 5463-7 [cit. 2017-01-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC431765/>
- [44] RONAGHI, M. DNA SEQUENCING: A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science* [online]. b.r., **281**(5375), 363-365 [cit. 2017-01-28]. DOI: 10.1126/science.281.5375.363. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.281.5375.363>
- [45] Single Stranded Templates for Pyrosequencing™. *Thermo Fisher Scientific* [online]. b.r. [cit. 2017-01-28]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/napamisc/capture-of-biotinylated-targets/single-stranded-templates-for-pyrosequencing.html>
- [46] DE MAGALHÃES, João Pedro, Caleb E. FINCH a Georges JANSSENS. Next-generation sequencing in aging research: Emerging applications, problems, pitfalls and possible solutions. *Ageing Research Reviews* [online]. 2010, **9**(3), 315-323 [cit. 2017-01-28]. DOI: 10.1016/j.arr.2009.10.006. ISSN 15681637. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568163709000749>
- [47] MARGULIES, Marcel, Michael EGHOLM, William E. ALTMAN et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* [online]. 2005, , - [cit. 2017-01-28]. DOI: 10.1038/nature03959. ISSN 00280836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature03959>
- [48] SHENDURE, Jay a Hanlee JI. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* [online]. 2008, **26**, 1135-1145 [cit. 2017-01-28]. DOI: 10.1038/nbt1486. Dostupné z: <http://www.nature.com/nbt/journal/v26/n10/full/nbt1486.html>
- [49] LU, Yuan, Yingjia SHEN, Wesley WARREN a Ronald WALTER. Next Generation Sequencing in Aquatic Models. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges* [online]. InTech, 2016 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.5772/61657. ISBN 9789535122401. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/next-generation->

sequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-in-aquatic-models

- [50] ANSORGE, Wilhelm J. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology* [online]. 2009, **25**(4), 195-203 [cit. 2017-01-29]. DOI: 10.1016/j.nbt.2008.12.009. ISSN 18716784. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678409000089>
- [51] VOELKERDING, K. V., S. A. DAMES a J. D. DURTSCHI Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry* [online]. 2009, **55**(4), 641-658 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112789. ISSN 00099147. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.112789>
- [52] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. ISBN 9788020017031.
- [53] Lipoproteiny (klinika). *WikiSkripta* [online]. 2015 [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Lipoproteiny_\(klinika\)](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Lipoproteiny_(klinika))
- [54] COOPER, Geoffrey M. *The cell: a molecular approach*. 2nd ed. Washington (DC): ASM Press, 2000. ISBN 0878931066.
- [55] LINDAHL, Tomas. *DNA Glycosylases, Endonucleases for Apurinic/Apyrimidinic Sites, and Base Excision-Repair* [online]. b.r., s. 135 [cit. 2017-02-04]. DOI: 10.1016/S0079-6603(08)60800-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079660308608004>
- [56] AHN, Woo Suk, Si Jae PARK a Sang Yup LEE. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* [online]. 2001, **23**(3), 235-240 [cit. 2017-02-12]. DOI: 10.1023/A:1005633418161. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1005633418161>
- [57] TSAKALI, Efsthia, Konstantinos PETROTOS, Angela D' ALLESSANDRO a Panagiotis GOULAS. *A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products: In: 6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry (FOODSIM 2010)*. CIMO, Braganca, Portugal, 2010.
- [58] MACWAN, Silviya R., Bhumika K. DABHI, S.C. PARMAR a K.D. APARNATHI Whey and its Utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [online]. 2016, **5**(8), 134-155 [cit. 2017-02-12]. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.508.016. ISSN 23197692. Dostupné z: <http://www.ijcmas.com/abstractview.php?ID=753&vol=5-8-2016&SNo=16>
- [59] LI, Ying, Bingnan LIU, Jinzhu SONG, Cheng JIANG a Qian YANG. Utilization of Potato Starch Processing Wastes to Produce Animal Feed with High Lysine Content. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **25**(2), 178-184 [cit. 2017-02-13]. DOI: 10.4014/jmb.1404.04035. ISSN 10177825. Dostupné z: <http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1404.04035>
- [60] TESFAW, Asmamaw a Fasil ASSEFA. Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture,

- and Immobilization. *International Scholarly Research Notices* [online]. 2014, **2014**, 1-11 [cit. 2017-02-13]. DOI: 10.1155/2014/532852. ISSN 23567872. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/532852/>
- [61] VENDRUSCOLO, Franciello. Starch: a potential substrate for biohydrogen production. *International Journal of Energy Research* [online]. 2014, **39**(3), 293–302 [cit. 2017-02-13]. DOI: 10.1002/er.3224. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/er.3224/abstract>
- [62] HAAS, Richard, Bo JIN a Florian Tobias ZEPF. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from Waste Potato Starch. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2014, **72**(1), 253-256 [cit. 2017-02-13]. DOI: 10.1271/bbb.70503. ISSN 09168451. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.70503>
- [63] EL-FALLAL, Amira, Mohammed ABOU, Ahmed EL-SAYED a Noha OMAR. Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* [online]. InTech, 2012 [cit. 2017-02-18]. DOI: 10.5772/51571. ISBN 9789535108641. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/carbohydrates-comprehensive-studies-on-glycobiology-and-glycotechnology/starch-and-microbial-amylases-from-concepts-to-biotechnological-applications>
- [64] New Uses for Crude Glycerin from Biodiesel Production. *Extension* [online]. 2012 [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: <http://articles.extension.org/pages/29264/new-uses-for-crude-glycerin-from-biodiesel-production>
- [65] THLIVEROS, Panagiotis, Esra UÇKUN KIRAN a Colin WEBB. Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. *Bioresource Technology* [online]. 2014, **157**, 181-187 [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.111. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414001369>
- [66] PPP Master Mix. *Top-Bio* [online]. b.r. [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <http://www.top-bio.cz/pcr-master-mixy-12.html?ppp-master-mix>
- [67] KAPA2G Robust. *KAPABIOSYSTEMS* [online]. b.r. [cit. 2017-04-13]. Dostupné z: <https://www.kapabiosystems.com/product-applications/products/pcr-2/kapa2g-robust-pcr-kits/>
- [68] KAPA Long Range. *KAPA BIOSYSTEMS* [online]. b.r. [cit. 2017-04-13]. Dostupné z: <https://www.kapabiosystems.com/product-applications/products/pcr-2/kapa-long-range-pcr-kits/>
- [69] Q5® High-Fidelity DNA Polymerase. *NEW ENGLAND BioLabs* [online]. b.r. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <https://www.neb.com/products/m0491-q5-high-fidelity-dna-polymerase>
- [70] Carrier-ACRYL. *Top-Bio s.r.o.* [online]. b.r. [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: <http://www.top-bio.cz/izolace-dna-a-rna-19.html?carrier-acryl#breadCrumbs>
- [71] Standardní sekvenační protokol pro běžné templáty - plazmidy a PCR produkty.. *SEQme* [online]. b.r. [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/cs/sekvenovani/standardseq>
- [72] Basic Local Alignment Search Tool. *National Center for Biotechnology Information* [online]. b.r. [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- [73] Serum Triglyceride Determination Kit. *SIGMA-ALDRICH* [online]. b.r. [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/tr0100?lang=en®ion=CZ&cm_sp=Insite_-_prodRecCold_xorders_-_prodRecCold2-1
- [74] DNA DAMAGE AND REPAIR. *SivaBiochem* [online]. b.r. [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: <http://www.sivabio.50webs.com/dam.htm>
- [75] CARRASCO, Mario, Pablo VILLARREAL, Salvador BARAHONA, Jennifer ALCAÍNO, Víctor CIFUENTES a Marcelo BAEZA. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiology* [online]. 2016, **16**(1), - [cit. 2017-05-12]. DOI: 10.1186/s12866-016-0640-8. ISSN 14712180. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/16/21>
- [76] VANĚK, Martin. *Studium karotenogenních kvasinek v průběhu růstu pomocí pokročilých instrumentálních technik*. Brno, 2017. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

26S	Velká ribozomální podjednotka
AA/Bis	Akrylamid/ <i>N,N'</i> -methylenbis(akrylamid)
AMP	Adenosinmonofosfát
ACL	ATP citrát lyasa
AP	Apurinic/apyrimidinic
APS	Amonium persulfát
ATP	Adenosintrifosfát
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CoA	Koenzym A
CoQ	Koenzym Q
CTP	Cytosintrifosfát
<i>CYTB</i>	Mitochondriální gen cytochrom <i>b</i>
D1/D2	Region velké ribozomální podjednotky DNA
DEB	Diepoxybutan
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
DHA	Dokosahexaenová kyselina
DMAPP	Dimethylalyl pyrofosfát
dsDNA	Dvouvláknová DNA
EMS	Ethylester kyseliny methansulfonové
EO	Ethylenoxid
<i>ERG</i>	Geny zapojené v syntéze ergosterolu
ETS	External transcription spacer
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
GC	Plynová chromatografie
GGPP	Geranyl-geranyl pyrofosfát
GMO	Geneticky modifikované organismy
GTP	Guanintrifosfát
HMG-CoA	β -hydroxy- β -methylglutaryl CoA
HPLC	Vysokoúčinná kapalínová chromatografie
ICTF	International Commission on the Taxonomy of Fungi (Mezinárodní komise taxonomie hub)
IPP	Isopentenyl pyrofosfát
ITS	Internal transcription spacer
LALS	Large angle light scattering
LSU	Velká ribozomální podjednotka
MVA	Mevalonová kyselina
MMS	Methylester kyseliny methansulfonové
NADPH/NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NTG	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
NTS	Non-transcribed spacer
PAL	Fenylalanin amoniak lyasa
PAU	Polycyklický aromatický uhlovodík
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PDA	Detektor fotodiodového pole
PGGE	Polyakrylamidová gradientová gelová elektroforéza

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>RPB1</i> a <i>RPB2</i>	Jednotky DNA polymerasy II
RT	Obrácená fáze
SALS	Small angle light scattering
ssDNA	Jednovláknová DNA
SSU	Malá ribozomální podjednotka
TAG	Triacylglycerol
TCA	Citrátový cyklus
<i>TEF-1</i>	Translační elongační faktor 1- α
TEMED	<i>N,N</i> -tetramethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Tymintrifosfát
UTP	Uraciltrifosfát
YPD	Yeast-pepton-D-glukóza médium