

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH KMENŮ KVASINEK Z ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ALENA BEČKOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ ÚSTAV CHEMIE
POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
DEPARTMENT OF FOOD AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH KMENŮ KVASINEK Z ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

CHARACTERIZATION OF CHOICE SPECIES OF ENVIRONMENTAL YEASTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ALENA BEČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0863/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Alena Bečková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901R021)
Vedoucí práce **Mgr. Dana Vránová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Charakterizace vybraných kmenů kvasinek z životního prostředí

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše na zadané téma
2. Popis vhodných a použitých metod k identifikaci a charakterizaci kvasinek z životního prostředí
3. Zpracování získaných výsledků a jejich zhodnocení formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Alena Bečková
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá identifikací sbírkových kvasinek získaných z různých podmínek životního prostředí. Sbírkové kvasinky byly získány ze Sbírkovy kultury kvasinek CCV Chemického ústavu Slovenské akademie věd v Bratislavě. Cílem je rozšíření databáze kvasin, která slouží v laboratoři Fakulty chemické při určování kvasinek odebraných ze vzorků potravin.

Identifikace kvasinek byla provedena pomocí metody PCR-RFLP. Sledovaný úsek se nachází v oblasti 5,8S-ITS a je vymezený primery ITS1 a ITS4. Při restrikční analýze byly použity restrikční endonukleasy *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *TaqI*^o.

U zkoumaných kvasinek byla dále zjišťována mimobuněčná lipolytická aktivita pomocí jednoduchého testu na agaru SpiritBlue, který působením lipas ztrácí modrý pigment.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis deals with identification type yeasts, which were obtained from the Culture Collection SAV in Bratislava. The purpose is extension of yeast database in laboratory of Faculty of Chemistry, which is used by identification yeasts in samples taken from food or environment.

Identification of yeasts was implemented by method PCR-RFLP. Obtained segment is located in area 5,8S-ITS and is defined by using primers ITS1 and ITS4. Restriction analysis was carried out by restriction endonuclease *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* and *TaqI*^o.

Chosen species were also tested for presence of extracellular lipase. In this part of characterisation was used SpiritBlue Agar. The presence of blue colour is lost by activity of lipase.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, identifikace, charakterizace, PCR, PCR-RFLP, kvasinkové lipasy

KEY WORDS

Yeasts, identification, characterisation, PCR, PCR-RFLP, yeast lipase

BEČKOVÁ, A. *Charakterizace vybraných kmenů kvasinek z životního prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 42 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu je majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Daně Vránové, Ph.D. z Ústavu Chemie potravin a biotechnologií Vysokého učení technického v Brně za konzultace a odborné vedení průběhu a zpracování této práce.

OBSAH

OBSAH	5
<u>1 ÚVOD</u>	<u>7</u>
<u>2 TEORETICKÁ ČÁST</u>	<u>8</u>
2.1 KVASINKY	8
2.1.1 ŽIVNÉ PROSTŘEDÍ KVASINEK, KULTURY	8
2.1.2 VELIKOST A TVAR BUNĚK	8
2.1.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ BUNĚČNÉ HMOTY KVASINEK	9
2.1.4 CYTOLOGIE KVASINEK	9
2.2 ROZMNOŽOVÁNÍ KVASINEK	12
2.2.1 VEGETATIVNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ KVASINEK	12
2.2.2 POHLAVNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ KVASINEK	12
2.3 TAXONOMIE KVASINEK	14
2.3.1 TŘÍDA ASCOMYCETES (ASCOMYCOTINA)	14
2.3.2 TŘÍDA BASIDOMYCETES (BASIDOMYCOTINA)	14
2.3.3 POPIS VYBRANÝCH DRUHŮ KVASINEK	14
2.4 METABOLISMUS KVASINEK	16
2.4.1 LIPOLYTICKÁ AKTIVITA KVASINEK	16
2.4.2 PROTEOLYTICKÁ AKTIVITA KVASINEK	16
2.5 VÝZNAM A VÝSKYT KVASINEK	17
2.5.1 VÝZNAM KVASINEK	17
2.5.2 VÝSKYT KVASINEK V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ	17
2.5.3 PATOGENNÍ KVASINKY	18
2.5.4 VYUŽITÍ KVASINEK V POTRAVINÁŘSTVÍ A JINÝCH ODVĚTVÍCH PRŮMYSLU	18
2.6 IDENTIFIKACE KVASINEK	21
2.6.1 IDENTIFIKACE NA ZÁKLADĚ FYZIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ	21
2.6.2 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE ZALOŽENÉ NA ANALÝZE DNA	22
<u>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>	<u>28</u>
3.1 POUŽITÉ MIKROORGANISMY	28
3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	28
3.3 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	28
3.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA A POUŽITÉ ROZTOKY	29

3.4.1	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍHO MÉDIA KE KULTIVACI SBÍRKOVÝCH KVASINEK	29
3.4.2	STANOVENÍ LIPOLITICKÉ AKTIVITY	29
3.4.3	PŘÍPRAVA 10×TBE PUFRU	29
3.4.4	PŘÍPRAVA 1×TBE PUFRU	30
3.4.5	PŘÍPRAVA DÉLKOVÝCH STANDARDŮ 100 BP A 20 BP	30
3.4.6	PŘÍPRAVA 2% AGARÓZOVÉHO GELU	30
3.4.7	PŘÍPRAVA 80% ETHANOLU	30
3.4.8	PŘÍPRAVA PCR SMĚSI	30
3.5	PRACOVNÍ POSTUPY	31
3.5.1	RESTRIKČNÍ ANALÝZA	31
3.5.2	KULTIVACE NA SPIRITBLUE AGARU	33
4	<u>VÝSLEDKY A DISKUSE</u>	34
4.1	PŘÍPRAVA IZOLOVANÉ DŇA ZE SBÍRKOVÝCH KVASINEK A AMPLIFIKACE POMOCÍ PCR	34
4.2	VÝSLEDKY DETEKCE PRODUKTŮ RESTRIKČNÍ ANALÝZY	34
4.2.1	RESTRIKČNÍ ENDONUKLEASA <i>HaeIII</i>	34
4.2.2	RESTRIKČNÍ ENDONUKLEASA <i>HinfI</i>	35
4.2.3	RESTRIKČNÍ ENDONUKLEASA <i>HhaI</i>	35
4.2.4	RESTRIKČNÍ ENDONUKLEASA <i>TaqI</i> ^d	36
4.3	TEST LIPOLYTICKÉ AKTIVITY	37
4.3.1	PŘÍPRAVA KULTIVACE NA SPIRITBLUE AGARU	37
4.3.2	VÝSLEDKY LIPOLYTICKÉ AKTIVITY	37
5	<u>ZÁVĚR</u>	38

1 ÚVOD

Kvasinky jsou lidstvem využívány již po dlouhá tisíciletí. Na základě nejstarších dochovaných nálezů záznamů o potravinářských postupech můžeme říci, že technologie využívající kvasinky k výrobě piva a vína, jsou staré až 6 000 až 8 000 let. První psané zmínky o pivu pocházejí ze starověké Mezopotámie. Postupně se člověk naučil využívat kvasinky i k fermentaci dalších surovin. Využívání fermentace je pro lidstvo důležité, protože je schopné prodloužit trvanlivost potravin a zlepšuje tak jejich odolnost vůči vnějším vlivům. [1]

Pestrá škála metabolických schopností a enzymového vybavení kvasinek je lidstvem využívána především v potravinářství k výrobě piva, vína, chleba, lihu, droždí, sýrů a jiných mléčných výrobků a dalších potravinářských komodit, ale také v krmivářství, při výrobě potravinářských doplňků, ve farmacii a v medicíně. Genetickou úpravou mohou kvasinky produkovat širokou škálu enzymů pro prakticky všechna odvětví vědy a průmyslu. [2, 3]

K identifikaci jednotlivých rodů a druhů kvasinek je možné využít molekulárně biologickou metodu PCR-RFLP. Vzorky z prostředí je však nejprve nutno přechistit a získat čisté kultury. Následně je z buněk čistých kultur vyizolována DNA, kterou je již možno analyzovat pomocí výše uvedené metody. V této práci byla otestována také lipolytická aktivita vybraných kmenů kvasinek.

V dobách, kdy nebyla známa genetika a molekulárně biologické metody, byla charakterizace a identifikace jednotlivých druhů kvasinek odlišná. Kvasinky bylo nejprve možno rozlišovat pouze pomocí sledování metabolických (biochemických) projevů nebo fyziologických a morfologických znaků, s vynálezem mikroskopu v novověku přibýlo pozorování buněk a jejich tvarů, případně způsobu množení a podobně. Nicméně i tyto metody jsou stále aktuální, jejich výhodou je například finanční nenáročnost a jednoduchost. [2]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotní mikroorganismy, taxonomicky se řadí mezi vyšší houby, avšak tvoří jednotnou skupinu. Obecně jsou charakteristické tím, že ve vegetativní fázi se rozmnožují pučením a mají heterotrofní metabolismus, vyznačující se především kvašením, které zabezpečuje zdroj energie a uhlíku. Mezi kvasinky řadíme třídy Askomyces, Basidomyces a Deuteromyces. [1, 4, 5, 6].

Kvasinky se ve srovnání s bakteriemi rozmnožují pomaleji, ale stále jsou dosti rychlé na to, aby úspěšně sloužily k tvorbě biomasy nebo jako modelové organismy v genetice. Využívá se snadné manipulace při práci s kvasinkami a možnosti regulace přechodů mezi haploidní a diploidní fází buněk. [6, 7]

2.1.1 Živné prostředí kvasinek, kultury

Kvasinky potřebují pro svoji existenci vodné prostředí a přítomnost živin. Teplotní rozmezí pro růst kvasinek je přibližně od -2 °C do 48 °C. Rozdělení kvasinek podle teplotní přizpůsobivosti je v tabulce 1. Jako zdroj uhlíku se v laboratorních podmínkách nejčastěji využívá glukosa. Většina kvasinek se řadí mezi fakultativně anaerobní, alespoň stopové množství kyslíku je potřebné k biosyntéze některých komponent buněčných membrán. Fakultativně anaerobní kvasinky dělíme do dvou typů. Tzv. fermentativní typy kvasinek i v anaerobních podmínkách převážně fermentují, podíl respirace představuje přibližně 10 % činnosti uhlíkatého metabolismu. Druhou a rozsáhlejší skupinou jsou kvasinky, u nichž nad fermentací převažuje energeticky výhodnější respirace. Ostatní kvasinky jsou obligátně anaerobní, z důvodu absence enzymu alkoholdehydrogenázy nemohou produkovat etanol, tedy nefermentují. [1, 8]

Tabulka 1: Rozdělení kvasinek podle teplotní charakteristiky rozmnožování [1]

Typ	Teplotní rozmezí rozmnožování	Poznámka
Psychrofilní	-2 – 20 [°C]	Pocházejí z vody, půdy Antarktidy např. některé druhy rodu <i>Cryptococcus</i> , <i>Candida</i>
Mezofilní	0 – 48 [°C]	Naprostá většina kvasinek, kultivační teploty 25-30 °C
Termofilní	více než 20 [°C]	Obvykle potenciální patogeny teplotokrevných živočichů

Na povrchu tuhého živného média vytvářejí kvasinky kolonie s hladkým, drsným, nebo slizovitým povrchem. Barva kolonií je obvykle krémová, některé kvasinky vytvářejí červené pigmenty nebo černé melaniny. [1]

Osmotolerantní kvasinky vyžadují ke kultivaci aktivitu vody menší, než 0,6. Vyznačují se také pomalým růstem. K těmto kvasinkám patří například některé druhy rodu *Debaromyces* a *Saccharomyces*. Existují také lipofilní kvasinky, které přítomnost tuku v kultivačním médiu přímo vyžadují. K takovým patří například rod *Pityrosporium*. [9, 10]

2.1.2 Velikost a tvar buněk

Samostatné buňky jsou velké od 2 až 3 μm do 20 až 50 μm, široké bývají 1 - 10 μm. Tvar buněk většinou elipsoidní, vejčitý až kulovitý. Další možnosti jsou citronovitý, trojúhelníkový a válcovitý. I ve stejné kultuře jednoho kmene se může vyskytovat více tvarů souběžně, například kulovité a elipsoidní buňky. [1, 4, 8]

Pučící kvasinky dělíme do tří skupin. Monopolární tvoří pupeny pouze v jednom místě, bipolární na dvou protilehlých pozicích. Multipolární v kterémkoli místě buňky, u toho typu pučení je prostorově omezen počet pupenů, které mohou vzniknout. Kvasinky pučící na sterigmě vytváří tenkou stopku mezi mateřskou buňkou a jejím pupenem. U rodu *Schizosaccharomyces* se vyskytuje přehrádečné dělení. [1]

Některé druhy nebo kmeny kvasinek tvoří pseudomycelium větvené nebo pseudomycelium s blastosporem, tedy buňky pučí pouze na pólech a neoddělují se, vznikají tedy dlouhá zaškrcovaná vlákna. Blastospory jsou svazky kratších elipsoidních buněk. Pseudomycelium vzniká většinou při nedostatku živin. Další druhy nebo kmeny vytvářejí pravé mycelium, které vzniká příčným dělením protáhlých buněk. [1, 4]

2.1.3 Chemické složení buněčné hmoty kvasinek

Zastoupení látek v buňkách závisí na druhu kvasinek, stáří buněk a kultivačních podmínkách. Voda tvoří největší podíl hmoty, přibližně 65-83 %, což je méně, než u bakterií. Zbylá procenta do celku se nazývají sušina. Největší podíl sušiny tvoří bílkoviny, okolo 50 %, dále nukleové kyseliny, přibližně 10 %. Strukturní polysacharidy (hlavně z buněčné stěny) tvoří kolem 5 % z celkové sušiny a kolem 80 % sušiny buněčné stěny. Popel, tedy nespalitelné minerály, tvoří přibližně 8 % sušiny. [4, 6]

2.1.4 Cytologie kvasinek

2.1.4.1 Pouzdro

Jen několik rodů kvasinek tvoří pouzdra. Pouzdro je složeno z radiálně orientovaných mikrofibril, vycházejících z buněčné stěny. Obsahuje vždy manosu a kyselinu glukuronovou, dále jiné sacharidy. Pouzdro se vytváří postupně s růstem pupene. Pouzdro poskytuje částečnou ochranu buněk vůči dehydrataci a napomáhá při ztížené difuzi živin do buňky. [1]

2.1.4.2 Buněčná stěna

Buněčná stěna obaluje cytoplasmatickou membránu a tvoří okolo ní pevnější krustu. Podobně jako u bakterií je silná a pevná, díky tomu udává tvar buňky a chrání ji před vnějšími vlivy, zejména mechanickými a osmotickými. Její struktura díky pórům umožňuje permeabilitu, propouští všechny látky kromě vysokomolekulárních, jako jsou polysacharidy a bílkoviny. Největší zastoupení mají v buněčné stěně polysacharidy, které tvoří 80 % sušiny stěny. Jsou uspořádány do husté spletené sítě. Tuto spleť vyplňují bílkoviny, které představují 6 až 10 % sušiny. Buněčná stěna dále obsahuje malé množství lipidů (3 až 10 %) a fosforečnanů, které jsou na polysacharidy vázány esterovými vazbami a spolu s karboxylovými skupinami dávají povrchu kvasinkových buněk záporný náboj, který ovlivňuje absorpci látek z prostředí. [1, 4, 6, 8]

Nejvýraznější z polysacharidů kvasinek jsou glukany, které se vyskytují ve všech druzích dosud analyzovaných kvasinek. Některé druhy obsahují ještě manany, glukosamin, chitin. [4]

Na povrchu stěny jsou zřetelné kruhy, které vznikly jako jizvy po pučení. Počet jizev se ve stáří buňky pohybuje v rozmezí 9 – 43, nejčastěji 15 – 24. Při bipolárním pučení vzniká vícenásobná jizva. Jedna jizva je vždy trochu odlišná, buňka si ji nese od oddělení od mateřské buňky a nazývá se jizva zrodu. [4, 6]

Buněčná stěna také hraje roli při shlukování buněk. Vegetativní buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou schopny shlukování do makroskopických měřítek, tzv. flokulace. Jev je založen na struktuře buněčných stěn jednotlivých buněk, která umožňuje vzájemnou

adhezi. Shluky následně sedimentují. Tohoto jevu se využívá v pivovarnictví před stáčením a filtrováním. [6, 8]

2.1.4.3 Cytoplasmatická membrána

Cytoplasmatická membrána kvasinek, také zvaná plasmalema, má obdobné složení jako u bakterií. Oproti buněčné stěně je tenká, skládá se z lipidů a proteinů. Tvoří četné vchlípeniny a záhyby, které vybihají do středu buňky. Je volně propustná pouze pro malé molekuly bez náboje, proto tvoří osmotické rozhraní mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky. Je sídlem transportních mechanismů, které umožňují přenášet žádané molekuly dovnitř buňky a jiné látky zase z buňky do vnějšího prostředí. [4, 10]

2.1.4.4 Cytoplasma

Cytoplasma vytváří základ vnitřního prostředí buňky. Jsou v ní umístěny organely, cytoskelet a probíhají zde důležité metabolické reakce. U mladých buněk je průhledná, u starších granulovitá. Obsahuje zrníčka zásobních látek, volutinu, neboli polymetafosfátu, glykogenu a lipidů. [4, 8, 10]

2.1.4.5 Endoplasmatické retikulum

Endoplasmatické retikulum je systém dvojitych membrán, které mají poměrně velké póry. Tvoří oddělené váčky obsahující různé enzymy a rezervní látky. Na vnějším povrchu endoplasmatického retikula je přichycené velké množství polysomů, jsou to shluky ribozomů, v nichž se syntetizují bílkoviny. [4, 8]

2.1.4.6 Mitochondrie

Mitochondrie jsou široké až 1 μm , dlouhé až 3 μm . Skládají se ze dvou membrán. Vnější a vnitřní, která má četné vchlípeniny zvané kristy. Jsou složeny hlavně z bílkovin, lipidů a fosfolipidů. Jsou sídlem dýchacích enzymů a systému oxidační fosforylace. Také zde probíhá syntéza některých mitochondriálních bílkovin, jsou zde tRNA, mRNA a ribozomy. [4]

2.1.4.7 Vakuola

Vakuola je organela kulovitého tvaru, je obklopená jednou membránou. Mladé nebo pučící buňky mají více malých, zralé buňky mají jednu větší. U starších buněk vakuola vyplňuje téměř celý prostor buňky. Vakuoly obsahují hydrolytické enzymy, jako jsou proteázy, ribonukleasa a esterasa, které slouží k rozkladu nepotřebných buněčných struktur. Dále obsahují ještě polyfosfáty a velké množství draselných iontů, aminokyselin a purinů. Slouží také k ukládání látek, které se právě neúčastní metabolických pochodů. [4]

2.1.4.8 Golgiho aparát

Golgiho aparát je soustava několika propojených měchýřků. Předpokládá se, že slouží k transportu prekurzorů buněčné stěny z cytoplasmy přes cytoplasmatickou membránu do vnějšího prostředí buňky, tedy do buněčné stěny. [4]

2.1.4.9 Jádro

Jádro hraje klíčovou roli při dělení buněk. Nachází se většinou ve středu buňky, od okolního obsahu buňky je odděleno dvojitou jadernou membránou, zvanou karyolema. Obsahuje především chromatin, tedy materiál nesoucí genetickou informaci. Je uspořádaný do úseků zvaných chromosomy. Počet chromosomů se v biologické taxonomii liší, taxony jsou rozdělené podle počtu a charakteru chromosomů. Nukleoplasma některých kvasinek obsahuje

také 1 - 2 μm velké kruhové úseky DNA nazývané plastidy. Součástí jádra je jadérko, které se nachází těsně pod jadernou membránou, a diskové polární tělísko vřeténka. [4, 8, 10]

2.1.4.10 Cytoskelet

Cytoskeletální síť slouží k udržení tvaru buňky, případně při pohybu sekrečních váčků a některých organel. U kvasinek zahrnuje mikrotubuly, aktinová políčka a mikrofilamenta, v jádře byly detekovány lamina, což jsou stavební glykoproteiny, které jsou v jádře využity k rozestoupení chromatid k polárním tělískům. [1, 11]

2.2 Rozmnožování kvasinek

2.2.1 Vegetativní rozmnožování kvasinek

Většina buněk se rozmnožuje vegetativně, pučením. Tento cyklus trvá při optimálních podmínkách přibližně 2 hodiny. Při pučení lze snadno rozeznat mateřskou buňku a pupen, dělí je úzký kanálek, kterým postupně proudí do pupenu organely, cytoplasma a další buněčná hmota. Pučení se ukončí přerušением kanálku a vytvořením buněčné stěny mezi oběma buňkami. Puppen se většinou oddělí, ale může zůstat i připojený. [4, 6]

Neoddělí-li se pupen, vzniká pseudomycelium, tedy řetězec jednotlivých samostatných buněk. Jen málo rodů vytváří příčným dělením protáhlých buněk pravé mycelium. Pravé mycelium se liší tím, že mezi buňkami jsou malé póry, kterými volně prochází cytosol. Blastokonidie, nepohlavní spory, se vyskytují na pseudomyceliu i pravém myceliu. Příčné dělení se odehrává dvěma způsoby, a to tvorbou pravého mycelia, kdy buňky zůstanou spojeny úzkým kanálkem, a bez tvorby pravého mycelia, kdy buňky zůstanou nebo nezůstanou spojeny. [4, 6]

Přechodovým typem mezi pučením a příčným dělením je pučení na široké základně. Pupen a mateřská buňka jsou v průběhu pučení spojeni širokým krčkem. [4, 6]

2.2.2 Pohlavní rozmnožování kvasinek

Kromě vegetativního rozmnožování se u kvasinek vyskytuje také pohlavní rozmnožování. Jeho výsledkem jsou pohlavní spory, askospory a basidiospory. Askospory, zvané též endospory, jsou spory umístěné uvnitř ve vřecku, zvaném též asku. Buňky tvořící askospory se nazývají sporogenní. Basidiospory, kterým se říká také exospory, jsou spory umístěné na vnější straně sporotvorných buněk. [4, 8]

Pohlavní rozmnožování je charakterizováno spájením dvou haploidních buněk, obsahujících n chromosomů, čili konjugací a spájením buněčných jader, resp. karyogamií. Vzniká tak diploidní jádro, které obsahuje $2n$ chromosomů. Následně se dělí meiosou, tak zvaným redukčním dělením. Meiosou vznikají čtyři haploidní jádra, obsahující opět n chromosomů, které mohou být přímo základem nových spor, nebo se dělí mitosou a až poté tvoří spory. Haploidní a diploidní fáze buněk se střídají. [4, 8]

2.2.2.1 Askosmycétní kvasinky

U askosmycétních, též askosporogenních, buněk vzniká spájením dvou pohlavních spor zygota, tedy buňka o $2n$ chromosomech. [4, 6]

Spájí-li se dvě přibližně stejné buňky, jedná se o izogamii spájení, jde i o buňky odlišné velikosti, hovoříme o heterogamním spájení. Heterogamní spájení je například opětovné spojení jader mateřské buňky a jejího pupene. Mateřská buňka poté začne pučet na opačné straně a vytvoří nový pupen. [4, 6]

Uvedené spájení mezi buňkou a jejím vegetativním potomstvem je možné pouze u homothalických kmenů. Kmeny zvané heterothalické mají buňky rozlišeného pohlaví a tvoří tak buňky dvou párovacích, respektive kopulačních typů. [4, 6]

U heterothalických kmenů kvasinek *Schizosaccharomyces pombe* jsou párovací typy označeny h^+ a h^- , nebo také P a M a u *Saccharomyces cerevisiae* a a α . Ke spájení dochází pouze tehdy, setkají-li se tyto dvě buňky ve vhodném růstovém prostředí. Buňky opačného párovacího typu k sobě přilnou a po spájení vznikne zygota, která je schopná se vegetativně množit. V nepřítomnosti zkvasitelných cukrů je metabolismus buněk silně aerobní, za těchto podmínek dochází ke sporulaci, celá buňka se přemění ve vřčko, čili askus. [4, 6, 8]

Délkou haploidní a diploidní fáze životního cyklu se liší rody nebo i druhy kvasinek. Často bývá jedna z nich velmi omezená. Například homothalické kmeny *Saccharomyces*

cerevisiae jsou charakteristické tím, že se spory brzy po vpučení spájejí a vegetativní haploidní fáze tak zde téměř neexistuje. Délku haploidní a diploidní fáze lze u některých kvasinek kultivačními podmínkami omezit. [4, 6, 8]

2.2.2.2 Basidomycétní kvasinky

Basidomycétní buňky tvoří exospory a sporigie. Haploidní buňky se rozmnožují pučením a po smíchání buněk opačných párovacích typů dochází k cytogamii a tvorbě dikaryotního mycelia, ve kterém jsou jednotlivé buňky vymezeny přepážkami. Na myceliu se vytvářejí charakteristické přezky, přes které přechází jedno jádro do sousední buňky. Tím je zabezpečeno, že po mitose jader mají obě buňky dvě různá haploidní jádra. Protože obsahují genetickou informaci ze dvou různých zdrojů, jsou heterokaryotické. [4, 6, 8]

Po určité době se vytvoří koncový nebo interkalární, tedy mezibuněčný, útvar obalený silnou buněčnou stěnou. Nazývá se teliospora a probíhá v něm spájení jader. Po určité klidové formě teliospora klíčí v promycelium, v němž nastává meiosa. Promycelium může být jednobuněčné, nebo rozdělené přepážkami na čtyři buňky. Z promycelia se pak pučením oddělují haploidní jednobuněčné sporigie jednoho, nebo druhého párovacího typu. Pučením poskytují sporigie vegetativní haploidní buňky, čímž se celý pohlavní cyklus uzavírá. [4, 6, 8]

Imperfektní stádium probíhá v případě, že kvasinka vytváří nepohlavní mitospory. O anamorfe hovoříme tehdy, je-li přítomno pouze imperfektní stadium. Při perfektním stádiu kvasinka vytváří pohlavní meiospory. Teleomorfa znamená, že v dané fázi je přítomno perfektní stadium. [2]

2.3 Taxonomie kvasinek

Zařazení kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů je založeno na genetické příbuznosti s houbami, jsou považovány za jejich redukovanou formu. Jsou tedy zařazeny v systému houby (Fungi), kde patří mezi vlastní houby (Eumycotina). Eumycotina zahrnuje dvě velká oddělení, a to vřeckovýtrusé houby (Ascomycotina) a stopkovýtrusé houby (Basidomycotina). Kvasinky, u nichž se neprokázalo sexuální rozmnožování, jsou zařazeny jako Deuteromycotina. [1, 2, 12]

V následujících odstavcích budou vypsány jen některé taxony.

2.3.1 Třída Ascomycetes (Ascomycotina)

Do třídy Ascomycetes řadíme: [12]

- Čeleď schizosaccharomycetes
- Čeleď Ascodaceae
 - Rod *Yarrowia*,
- Čeleď Endomyceae
 - Rod *Saccharomyces*
- Čeleď Saccharomycetaceae
 - Rod *Pichia*
 - Rod *Issaatchenkia*
 - Rod *Debaromyces*
 - Rod *Kluyveromyces*
 - Rod *Zygosaccharomyces*
 - Rod *Saccharomyces*

Anamorfní formy alogenních kvasinek [12]

- Rod *Candida*
- Rod *Trigonopsis*

2.3.2 Třída Basidomycetes (Basidomycotina)

Do třídy Basidomycetes řadíme několik rodů: [1, 12]

- Rody *Rhodotula*
- *Rhodosporium*
- *Cryptococcus*

2.3.3 Popis vybraných druhů kvasinek

2.3.3.1 *Kluyveromyces lactis*

Vegetativní buňky jsou kulovité až elipsoidní, mohou se sdružovat do párů, malých shluků, nebo zůstávat jednotlivě. Kolonie jsou krémové do hněda, šeda nebo růžova, povrch hladký i bradavčitý, slizký i matný. V kapalných médiích vytváří prstenec, sediment, většinou i tenkou kožku na povrchu. [13]

Ve vegetativní fázi rozmnožování převládá haploidní stav, rozmnožuje se pučením. *Kluyveromyces lactis* je heterotalický kmen, po smíchání opačných párovacích typů se tvoří zygoty, které zpravidla ihned vytváří spory. Diploidní stav kvasinky je tedy jen přechodný. Vytváří

se 1-4 spory, které jsou kulovité, hladké a z vřeka se snadno uvolňují a aglutinují. [13]

Kluyveromyces lactis kvasí laktosu, sacharosu, ale nekvasí maltosu. Je součástí kefirových zrn, také se přidává do sýrů s plísní uvnitř. Produkuje β -galaktosidasu, pomocí níž může využívat laktosu ze syrovátky. [13]

2.3.3.2 *Pichia fermentans*

Buňky *Pichia fermentans* jsou elipsoidní až protáhlé. Pseudomycelium je stromečkovitě větvené. Kolonie jsou bílé, matné a kučeravé, okraj cípovitý. Při růstu na kapalném mediu se tvoří suchá šplhavá kožka. Při pohlavním rozmnožování se asky tvoří i bez předchozí konjugace, i po ní. Spory jsou kloboukovité, v asku po dvou až čtyřech. Je to heterotalický druh. [13]

Nezkvašuje maltosu, sacharosu, ani laktosu, zkvašuje glukosu. Vyskytuje se ojedinelé na přírodních stanovištích, například na vinicích nebo ve víně. [12, 13]

2.3.3.3 *Debaromyces hansenii*

Buňky *Debaromyces hansenii* jsou elipsoidní až protáhlé. Vytváří stromečkovité pseudomycelium. Kolonie jsou bílé nebo skořicově bílé, matné a kučeravé, okraj je cípovitý. Na povrchu kapalného média tvoří suchou kožku. Při pohlavním rozmnožování vznikají asky bez předchozí konjugace nebo po izogamní či heterogamní konjugaci. [13]

Nezkvašuje maltosu, sacharosu, ani laktosu, zkvašuje glukosu. Kvasinka dobře snáší prostředí s nízkou aktivitou vody. Některé její kmeny tolerují salinitu okolního prostředí až do 20 - 22 % chloridu sodného, navíc může růst i při nízkých teplotách. Dále se vyznačuje schopností metabolizovat kyselinu mléčnou a kyselinu citronovou. Nejvíce se vyskytuje v různých typech sýrů, některé kmeny jsou součástí kultur tepelně neopracovaných fermentovaných masných výrobků. Hojně se vyskytuje na fermentovaných klobásách a nasoleném mase. Kontaminuje mléčné výrobky, maso a majonézy. Může se také vyskytovat na kůži lidí a zvířat. V tekutých výrobcích vytváří bílý kožovitý povlak. [8, 10, 13, 14]

2.3.3.4 *Cryptococcus saitoi/friedmanii*

Kvasinka *Cryptococcus friedmanii* je jeden z druhů, které byly nalezeny na Antarktidě. Bylo u ní prokázáno pouze vegetativní rozmnožování. Optimální teplota k inkubaci je 17 °C. Kolonie mají hladký okraj, krémovou barvu a hebký, matný vzhled. Buňky mají většinou oválný tvar. Byla pozorována mnohvrstvá buněčná stěna. [15, 16]

Kvasinka prokázala schopnost zpracovávat glukosu, maltosu a škrob, nezpracovává laktosu, neprodukuje methanol, ani ethanol. Radíme ji mezi nefermentativní kvasinky. [15, 16]

2.4 Metabolismus kvasinek

Kvasinky jsou heteroorganotrofní organismy obecně s fakultativně anaerobním metabolismem. Zdrojem uhlíku a energie jsou jednoduché sacharidy, cukry. Hlavní zásobní látkou je u kvasinek glykogen. [1, 8]

Většina kvasinek se řadí mezi fakultativně anaerobní, alespoň stopové množství kyslíku je potřebné k biosyntéze některých komponent buněčných membrán. Fakultativně anaerobní kvasinky dělíme do dvou typů. Tzv. fermentativní typy kvasinek i v anaerobních podmínkách převážně fermentují, podíl respirace představuje přibližně 10 % činnosti uhlíkatého metabolismu. Druhou a rozsáhlejší skupinou jsou kvasinky, u nichž nad fermentací převažuje energeticky výhodnější respirace. Ostatní kvasinky jsou obligátně anaerobní, z důvodu absence enzymu alkoholdehydrogenázy nemohou produkovat etanol, tedy nefermentují. [1]

Za aerobních podmínek probíhá u většiny kvasinek zpracování cukrů Krebsovým cyklem, u převážně fermentujících kvasinek fermentační cestou. Hlavním produktem kvašení je etanol. Fermentace je regulována přísunem kyslíku do buňky tak, že dostatek kyslíku v prostředí fermentaci tlumí a nahrazuje ji respirace, která je energeticky výhodnější. [1]

Fakultativně anaerobní kvasinky dělíme na fermentativní a nefermentativní. Fermentativní typy kvasinek zkvašují cukry i za aerobních podmínek. Nefermentativní typy kvasinek cukry nezksvašují. U respiračních typů převládá vždy respirace nad fermentací. [10]

Kvasinky křísotvorné jsou striktně aerobní a na cukerných roztocích tvoří tenké blanky, tzv. křísy. Vytváří estery, které jsou zdrojem zápachu. Mezi křísotvorné kvasinky patří například kvasinky rodu *Hansenula* a *Pichia*. Křísotvorné kvasinky se mohou vyskytovat například na vinné révě a mají vliv na výsledný buket vína. [9, 10, 17]

Nejsnazšími zdroji dusíku jsou aminokyseliny a amonné ionty. Některé rody kvasinek umí využít i dusičnany, případně dusitany. [1]

2.4.1 Lipolytická aktivita kvasinek

Výraznou lipolytickou aktivitou jsou charakteristické kvasinky *Candida lipolytica*, *Candida rugosa* a *Yarrowia lipolytica* a kvasinky rodu *Pityrosporum*. Jeden z nejvýznamnějších enzymů je triacylglycerol acylhadrolasa, která katalyzuje hydrolýzu triglyceraldehydů na diglyceraldehydy a mastné kyseliny. Mastné kyseliny jsou dále zpracovávány β -oxidací až na acetyl-koenzymA. [2, 9, 18, 19]

2.4.2 Proteolytická aktivita kvasinek

Kvasinky obsahují poměrně velký podíl bílkovin v buněčné hmotě. Proteasy pracující s proteiny uvnitř buňky se nacházejí v cytoplasmě. [2]

Ke štěpení bílkovin dochází uvnitř kvasinkové buňky, kam bílkoviny procházejí rozložené na peptidy. Pro degradaci jsou někdy peptidy označovány, například fosforylací nebo určitou skupinou aminokyselin na začátku polypeptidového řetězce. Dalším příkladem je ubiquitin, který je složen ze 76 aminokyselin s vyčnívající karboxylovou skupinou, přes kterou se váže na vyčnívající aminoskupinu lysinových zbytků proteinů. Takto označené proteiny jsou degradovány v cytoplasmě. [1]

2.5 Význam a výskyt kvasinek

2.5.1 Význam kvasinek

Kvasinky se zapojily do ekosystému jako spotřebitelé sacharidových materiálů. Člověku slouží při mnohých potravinářských a průmyslových výroбах. Druhy *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* slouží jako modelové eukaryotní organismy. Některé kvasinky mohou být patogenní. [1]

2.5.2 Výskyt kvasinek v životním prostředí

Kvasinky upřednostňují rostlinné tkáně, avšak v menším měřítku je možné je najít i na tkáních živočišných. Menší zastoupení mají buňky kvasinek v půdě a ve vzduchu. Kvasinky se vyskytují především na substrátu obsahujícím sacharidy, zejména na ovoci, nejvíce bobulovitém a peckovitém, a potravinách obsahujících jednoduché sacharidy. Přeneseně je najdeme v nektarech květů, v trávicím traktu lidí, zvířat a některého hmyzu, kde se uchytily s potravou. Kvasinky se šíří převážně větrem a hmyzem, vzdušná kontaminace je významná zejména po dobu kvetení stromů a zrání ovoce. [2, 6, 8]

2.5.2.1 Výskyt na potravinách a v ovoci

Protože se kvasinky rozmnožují pomaleji než bakterie, uplatňují se nejvíce na potravinách, které jsou pro bakterie nevhodné. Nejčastěji jsou to potraviny s nízkým pH, s vysokým obsahem cukru nebo soli nebo také potraviny konzervované organickými kyselinami. Z potravinářských výrobků bývají napadány ovocné kompoty, džusy, saláty, slazené limonády či slaběji alkoholické nápoje typu piva nebo vína. Med, čokoládové náplně a podobně koncentrované potraviny mohou být napadeny osmotolerantními kvasinkami, jako jsou *Debaromyces hansenii* nebo *Zygosaccharomyces rouxii*. Kvasinky se mohou podílet také na kvašení fermentovaných mléčných, masných výrobků a výrobků obsahujících majonézu. Divoké kmeny kvasinek jsou obávaným kontaminantem v droždárnách. [2, 8]

Měkké ovoce je pro kvasinky velice vhodným substrátem, protože obsahuje vysoké procento jednoduchých sacharidů. Můžeme na něm nalézt kmeny kvasinek *Saccharomyces*, *Saccharomycodes* a *Kloeckera*. Nektar květů běžně obsahuje kmeny kvasinek *Cryptococcus* nebo *Rhodotula*. [6, 20]

2.5.2.2 Vzduch, voda

Ve vzduchu a ve vodě se převládají kvasinky obsahující barviva, například rod *Rhodotula*. Tento kmen obsahuje karotenoidy, které díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem pohlcují UV záření. Ve sladkých i mořských vodách žije kvasinka *Debaromyces hansenii*. Některé kmeny byly nalezeny ve sněhu na Antarktidě, v arktických vodách se vyskytuje kvasinka *Leucosporium*. Kvasinkami hojně osídlený je plankton, zejména mořské řasy. Zde jsou zastoupeny zejména rody *Rhodotula*, *Cryptococcus* a *Candida*. V domovních odpadech se vyskytují kvasinky různých fermentačních typů jako indikátor fekálního znečištění. Jedná se o různé druhy rodu *Saccharomyces*, *Kloeckera apiculata* nebo *Candida albicans*. [6, 20, 21, 22, 23]

2.5.2.3 Půda

V půdě je kvasinek mnohem méně, než plísní a bakterií, jsou zastoupeny především při povrchu. Výskyt některých kvasinek v půdě odráží ekosystém daného místa, například kvasinky z listů. Jiné poměry jsou na Antarktidě, kde jsou kvasinky převažujícími mikroorganismy. V půdě úspěšně přežívají kvasinky sporulující a kvasinky, které vytvářejí pouzdra. Typičtí půdní zástupci jsou například rody *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, nebo některé

druhy rodu *Cryptococcus*. Půdní kvasinky napomáhají štěpení organických zbytků v půdě, přesto nehrají v tomto směru význačnou úlohu. [22, 23]

2.5.2.4 Rostliny

Na listech rostlin se vyskytuje kvasinka s černým barvivem *Aureobasidium pullulans*. Dále se kvasinky hojně vyskytují na rostlinných výměšcích společně s bakteriemi a prvoky. Výskyt konkrétních druhů se liší podle geografických podmínek. V zahánvajících kaktusech žijí kvasinky v symbiose s bakteriemi, které jsou na rozdíl od kvasinek vybaveny pektolytickými enzymy. V tomto případě je výskyt kvasinek druhově specifický, menší vliv mají geografické podmínky. [24, 23]

Přirozeného výskytu kvasinek na bobulích hroznového vína se využívá ve vinařské technologii. Při kvašení se v některých případech kvasinky již nedodávají, ale používají se tyto přírodní zdroje. Tyto přírodní kvasinky mají význam i na oblastní specifitu vín. [12]

2.5.2.5 Živočichové

Kvasinky se také běžně vyskytují v trávicím traktu živočichů, zejména ve střevech. Kvasinky jsou přenášeny drozofilami, které se kvasinkami i živí. Kvasinky byly zjištěny i jako intracelulární symbionti, například u červotočovitých působí kvasinka *Torulopsis ernobii*. [23, 24]

2.5.3 Patogenní kvasinky

Oproti bakteriím je patogenních kvasinek velmi málo. Napadají většinou oslabené organismy, ovšem onemocnění způsobené kvasinkami mohou být až smrtelné. Kvasinková onemocnění nelze léčit antibiotiky, ale používají se antimykotika působící na buněčné stěny nebo cytoplasmatické membrány patogenů. Nejvíce onemocnění vyvolává kvasinka *Candida albicans*. Určité množství této kvasinky je u některých zdravých jedinců nalézáno ve stolici nebo moči, avšak onemocnění nemusí nutně propuknout. Dalším příkladem je kvasinka *Cryptococcus neoformans*, která se přenáší vzduchem, je vdechnuta a následně způsobuje onemocnění plic. Může napadat i nervovou soustavu, v této fázi je onemocnění přibližně v polovině případů smrtelné. [1]

2.5.4 Využití kvasinek v potravinářství a jiných odvětvích průmyslu

Využití kvasinek v různých biotechnologických oborech lidské činnosti je rozsáhlé. Stručný přehled je uveden v tabulce 2. [2]

Tabulka 2: Přehled využití kvasinek v různých oborech lidské činnosti [2]

Oblast využití	Praktický příklad
Potravinářský průmysl	Fermentované nápoje, fermentované mléčné výrobky
Chemický průmysl	Výroba chemických látek, například organických kyselin nebo bioethanolu
Farmaceutický průmysl	Vakcíny, probiotika, hormony, krevní faktory
Obecná biologie	Buněčná biologie, genetika, molekulární biologie, biochemie
Zdravotnický průmysl	Výzkum nádorových onemocnění, AIDS, metabolismu léků, genotoxicity, lidských genetických poruch
Technologie životního prostředí	Využití odpadu, ochrana plodin, biologické zachytávání kovů

Nejrozšířenější a nejznámější využití kvasinek je při výrobě pečiva a alkoholických nápojů. Nejrozšířenější je pivo a víno, dále existují různé lokální kvašené nápoje, například cider, pombe nebo saké. V potravinářství se využívají také kvasničné autolyzáty a extrakty. Slouží jako potravinářské přísady do polívek nebo omáček a také jako složka živných médií ke kultivaci. Kvasinky společně s bakteriemi se kvasinky podílejí na výrobě sojové omáčky, kefiru, řeckých oliv, vína a piv typu afrického a typu Lambic. [2, 18]

V krmivářství se uplatňují krmné kmeny a kmeny, ze kterých se vyrábí potravinářské doplňky. Kvasničný extrakt je bohatý na bílkoviny, aminokyseliny a vitaminy, hlavně vitamin B. Krmné droždí lze vyrábět z některých potravinářských odpadů. Cílem produkce krmných kvasinek je kvasinková hmota, která je výživná. [2, 4]

Kvasinky jsou podle různého enzymového vybavení používány k výrobě organických kyselin, například kyseliny mléčné, octové, máselné, citrónové, šťavelové a dalších. Kvasinky jsou také využívány k výrobě dalších látek, jako jsou antibiotika, aminokyseliny, enzymy, nukleotidy, dále vitaminy a provitaminy A a D. Jsou také schopné zpracovávat některé odpadní suroviny, například komponenty dřevní hmoty, n-alkany, metanol, přebytky potravinářských výrob, například laktosu v syrovátce, nahnílé ovce nebo změkklé brambory. [1, 6, 18, 23]

Tabulka 3: Technologické využití některých kvasinek [1, 6, 8, 14, 23]

Mikroorganismus	Produkty	
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Nápoje	Pivo, víno, pečivo
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		„pombe“
<i>Candida kefir, Kluyveromyces marxianus var. lactis</i>		Kefír, kumis
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Výživa	Krmné droždí
<i>Candida utilis</i>		
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>		
<i>Kluyveromyces lactis</i>		
<i>Debaromyces hansenii</i>	Vitaminy	Pekařské droždí, kvasničné extrakty, hydrolyzáty
<i>Eremothecium ashbyi</i>		Sýry s plísní uvnitř
<i>Ashbya gossypii</i>		Fermentované klobásy
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>		Riboflavin – B2
<i>Rhodotula sp.</i>		Ergosterol – provitamin D
<i>Aureobasidium pulluans</i>	Látky podporující imunitu	Beta-karoten – provitamin A
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Využití v ostatních odvětvích průmyslu	Glukany, manany
<i>Candida utilis, C. tropicalis, C. oleophila</i>		Láh potravinářský, průmyslový
		Biomasa, krmné droždí

2.5.4.1 Využití kvasinek při výrobě sýrů

Sýr se vyrábí z mléka vysoké kvality, které prošlo šetrnou pasterací a je mikrobiologicky čisté. Do takto připraveného mléka se přidávají čisté kultury nebo enzymy, které mléko vysráží. Při enzymatickém vysrážení se používá syřidlo, respektive enzym rennin (kaseinová koaguláza nebo chymozin). Po odloučení syrovátky se hmota, zvaná sýřenina, solí, nechá se odkapat a přidají se bakterie mléčného kvašení, zejména rody *Streptococcus* a *Lactobacillus*. Kultury produkující kyselinu mléčnou nejsou do sýrů vhodné. Po vytvoření tvarohu se oddělí syrovátka a zbylá hmota se oddělí, promyje, stlačí, často převarí a prosolí. Hmota je nyní ve fázi zrajícího sýra. [18, 25, 26, 3]

Různé typy sýra zrají při různých teplotách podporujících kultivované mikroorganismy. Někdy je sýr namočen do solanky, která podporuje růst určité žádané populace bakterie nebo plísně v průběhu zrání. Některé typy sýrů zrají bez přidaných kultur. Jiné sýry se nenechávají zrát vůbec nebo téměř vůbec. U zrajících sýrů probíhá fermentace od jednoho do 16 měsíců podle typu sýra. V průběhu zrání je hmota změkčována enzymy a sýr získává charakteristické aroma. Nezrající sýr se běžně očkuje sporama plísní zejména různé druhy rodu *Penicillium*. [3]

Bylo zjištěno, že kvasinky se hojně vyskytují v sýrech. Tento jev může souviset se schopností růstu při nižších teplotách, asimilací nebo fermentací laktosy a schopností asimilace organických kyselin. U kvasinek byla prokázána rezistence vůči vyšším koncentracím soli a produkce lipas a proteas, které jsou při zrání sýra velmi užitečné. Význam přítomnosti jednotlivých rodů kvasinek u mikrobiologického zpracování sýra je odvislý od druhu podle toho, jak vhodný typ metabolismu mají. Kvasinky také přispívají k charakteristickým vlastnostem jednotlivých typů sýrů, jako jsou aroma nebo textura. Přirozený výskyt kvasinek v sýrech vyrobených v malovýrobách nebo v domácích podmínkách. Největší zastoupení mají *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, dále *Saccharomyces cerevisiae* a některé druhy *Rhodotula*. V některých sýrech také byly nalezeny kvasinky *Kluyveromyces lactis* a *Yarrowia lipolytica*. [27, 28, 29, 30]

2.6 Identifikace kvasinek

Identifikace kvasinek je již dlouhá léta prováděna na základě fyziologických vlastností druhů. Pomocí zavedených metod se zjišťují charakteristické projevy zkoumaných kolonií a srovnáním tomu lze vzorky zařadit do taxonomického systému. V posledních desetiletích se objevují také metody založené na přímém zkoumání genetické informace organismů. Oba tyto směry laboratorní práce se vzájemně doplňují a i přes pokroky moderní techniky jsou stále využívány i tradiční způsoby identifikace kvasinek. [11]

2.6.1 Identifikace na základě fyziologických vlastností

2.6.1.1 Morfologické vlastnosti

S objevem mikroskopu se začalo rozvíjet posuzování mikroorganismů podle jejich morfologických vlastností. Měří se velikost buněk, pozoruje se jejich tvar. Tvar buněk bývá většinou kulatý, oválný až elipsovité, některé kvasinky však tvoří tyčinky, trojúhelníčky nebo citronovité zakřivení v protilehlých pólech buněk. Hyfy se posuzují podle větvení, tvarů spor a asků. Lze pozorovat přítomnost pouzder a měřit jejich tloušťku. Dalším znakem je pohlavní rozmnožování, které není přítomno u všech kmenů nebo rodů. Některé kvasinky se množí pučením, jiné dělením přehrádkami vytváří nepravé hyfy. U kolonií kvasinek se posuzuje vzhled povrchu, hladkost, pravidelnost kruhového tvaru a tvar okraje. V kapalném prostředí se pozoruje zákal a schopnost sedimentace. [31]

2.6.1.2 Testy metabolismu a vlivu prostředí

Podle schopností kvasit různé sacharidy se kvasinky rozdělují na různé kvasné typy. Základní testy se provádí na mono a disacharidech. Kmeny, které nekvasí glukosu, nekvasí ani žádný jiný cukr. Kmeny, které kvasí glukosu, kvasí také manosu a fruktosu a mohou kvasit oligosacharidy. Kmeny, které kvasí maltosu, nekvasí laktosu a opačně. [31]

Podobně jako typy kvašení se zkoumají i schopnosti využití různých zdrojů uhlíku a dusíku. Pozoruje se růst bez zdroje a dále růst s přidáním libovolné uhlíkaté nebo dusíkaté látky. [31]

Mezi další metabolické testy patří hydrolýza škrobu nebo důkaz redukce dusičnanu na dusitan. Lze pozorovat také růst v prostředí bez vitaminů nebo potřeba jednotlivých druhů vitaminů. [31]

Dále lze zkoumat vliv různých látek v prostředí na růst buněk. Nejvyužívanější testy jsou na různé organické kyseliny, antibiotika, toleranci alkoholu a vyšších koncentrací sacharidů nebo soli. [31]

2.6.1.3 Testování enzymového vybavení

Laboratorními testy lze stanovit lipasy, proteasy, ureasy, katalasy, DNAsy a RNAsy, hydrolasy nebo fosfatasy. [31]

2.6.1.4 Důkaz lipas

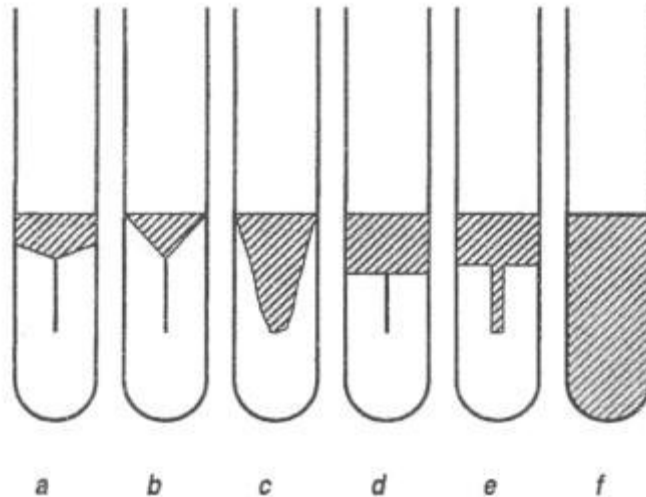
Kvasinky štěpí triacylglyceroly na diacylglyceroly, monoacylglyceroly, glycerol a volné mastné kyseliny. Vlivem volných mastných kyselin se snižuje pH a na základě této změny je možno provádět měření nebo pozorování.

Komerční práškové medium SpiritBlue Agar indikuje tuto změnu pH barvívem Spirit Dye, které tvoří s tukovou fází komplex. Tento komplex je odpovědný za modré zabarvení kultivačního média. Je-li tuková fáze rozkládána, komplex se rozpadá a modré zabarvení vymizí. Jako tuková fáze může být použit tributyrin nebo například slunečnicový olej. [19]

Další možností je překrytí ztuhlého hovězího tuku agarem přidaným uhličitanem vápenatým. Půda není zakalená v místě, kde se tuk štěpí. [31]

2.6.1.5 Důkaz proteas

Proteasy se stanovují na základě zkapalňování želatiny. Kvasinky, které jsou schopny produkovat proteasy, ztekucují želatinu. Hodnotí se tvar a množství ztekucené hmoty. Možné tvary ztekucení jsou znázorněny na Obrázku 1. [31]



Obrázek 1: Způsoby ztekucení želatiny, a - miskovitě, b - nálevkovitě, c - vakovitě, d -vodorovné, e - vrstevnatě, f – úplné [34]

2.6.2 Metody molekulární biologie založené na analýze DNA

Metody molekulární biologie jsou na analýze specifického úseku DNA nebo RNA mikroorganismu, který je pro daný taxon vhodným způsobem charakteristický.

2.6.2.1 Izolace nukleových kyselin

Izolace nukleových kyselin z buněk je základním krokem pro zkoumání genetické informace buněk. Je-li tento krok proveden chybně, je negativně ovlivněn i výsledek práce.

Cílem izolace je získat nukleovou kyselinu v dostatečném množství a přijatelné čistotě. Využívá se rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul, adsorpce na pevný podklad nebo ultracentrifugace na gradientních roztocích. Metod vedoucích k izolaci nukleových kyselin je několik, volba té nevhodnější závisí na požadavcích dalšího zpracování. [32]

Kultury buněk je potřeba oddělit od růstového média. Vnitřní obsah buněk je nutné odprostit od buněčných stěn a cytoplasmatických membrán. U buněk rostlin a hub se často využívá kombinace mechanického rozrušení a působení degradačních enzymů. Aby nedošlo k fragmentaci DNA chromosomů, je nutné použít co nejjemnější podmínky lyze, tedy udržovat lyzační směs v pufrovaném médiu a v chladu. [32]

Ze směsi ribonukleových a deoxyribonukleových kyselin lze RNA snadno odstranit působením ribonukleasy. Pokud není určitá kontaminace RNA nežádoucí, je možné tento krok vynechat. Pro odstranění bílkovin se používají proteinázy. Tento krok je důležitý, protože některé enzymy se váží na nukleové kyseliny a ovlivňují tak jejich aktivitu. Pro odstranění proteinů z buněčných lyzátů se hojně používá směs fenolu a chloroformu. [32]

Po extrakci proteinů zůstává vodný roztok s nukleovými kyselinami, který je však hodně naředěný. Navíc obsahuje určité množství rozpuštěného fenolu a chloroformu. Srážení

nukleových kyselín probíhá pomocí etanolu nebo izopropanolu a přítomnosti jednomocných iontů (Li^+ , K^+ nebo NH_4^+). Výhodou je, že při laboratorní teplotě se DNA sráží více, než RNA. Sráží-li se zároveň i soli přítomných látek, lze je promýt 70% etanolem. [32]

2.6.2.2 Polymerázová řetězová reakce

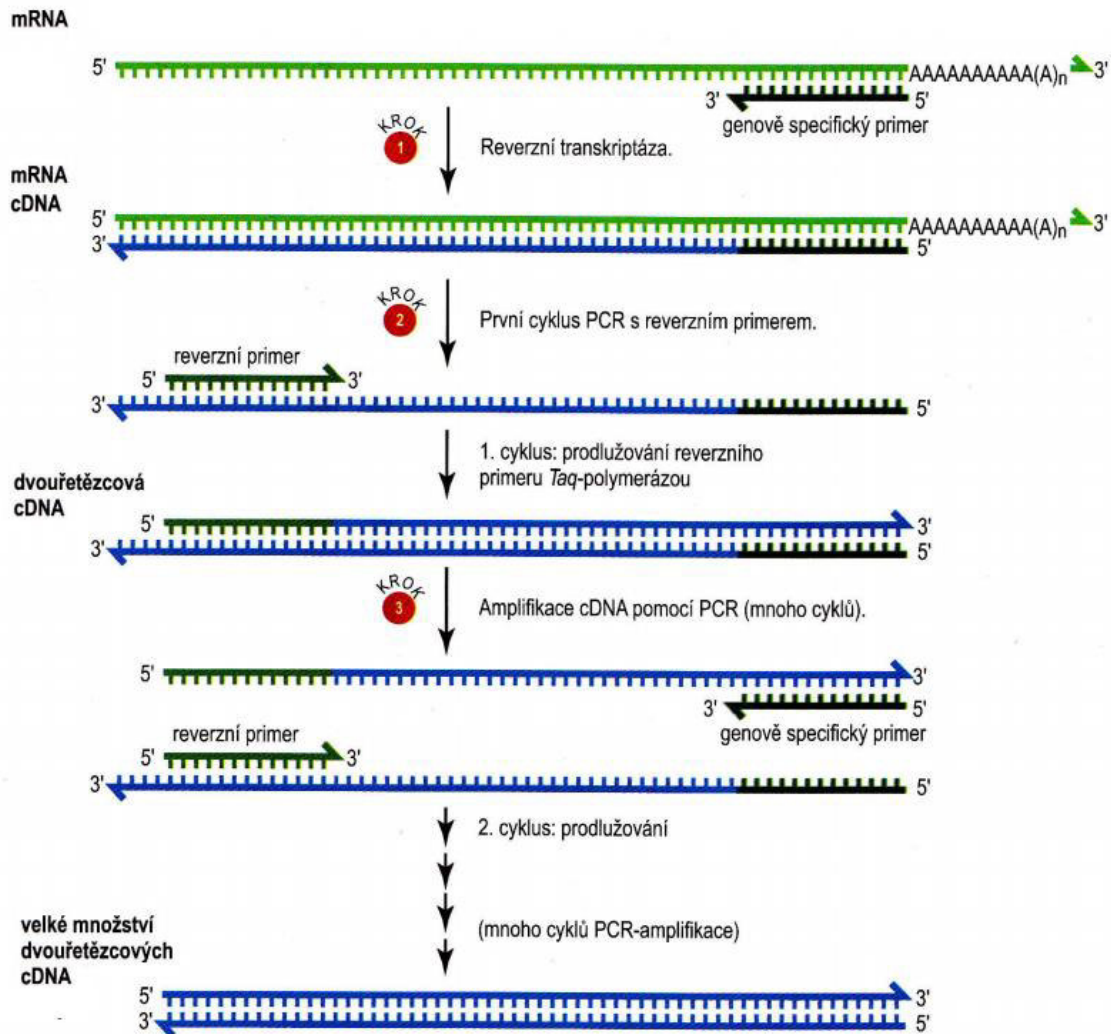
Polymerázová řetězová reakce, zkráceně PCR, je metoda snadného a rychlého namnožení vymezeného úseku molekuly DNA. Klíčovou práci odvádějí enzymy, které slouží k syntéze žádaného úseku DNA.

Replikace funguje díky přednastaveným změnám teploty, při každém teplotním stupni pracují právě potřebné enzymy. V každém cyklu se pravidelně střídají tři kroky: [32, 33]

- Denaturace vstupních dvouřetězcových molekul DNA při 94 °C.
- Připojení primerů k odděleným řetězcům DNA při 30 – 65 °C
- Syntéza nových protilehlých řetězců DNA DNA-polymerázou při 65 – 75 °C. [32]

Studovaný úsek DNA je vymezen dvojicí primerů, které se váží na 3' konce denaturované DNA. Polymerázy syntetizují daný úsek ve směru 5' konce ke 3' konci řetězce DNA. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů probíhá syntéza obou vláken na obou matricových řetězcích zároveň. Používané DNA-polymerázy jsou tepelně stabilní enzymy, aby odolávaly teplotám, při kterých DNA v každém cyklu denaturuje. Reakce probíhá ve speciálním reaktoru, termocykléru, který automaticky mění teploty podle nastavení a podle počtu cyklů. V našem případě probíhá 25 cyklů, během kterých se syntetizují nové molekuly úseků DNA vymezených DNA-polymerázami. Při ideálním průběhu se podle geometrické řady nasyntetizuje z jedné molekuly DNA 8 388 608 nových molekul. [32]

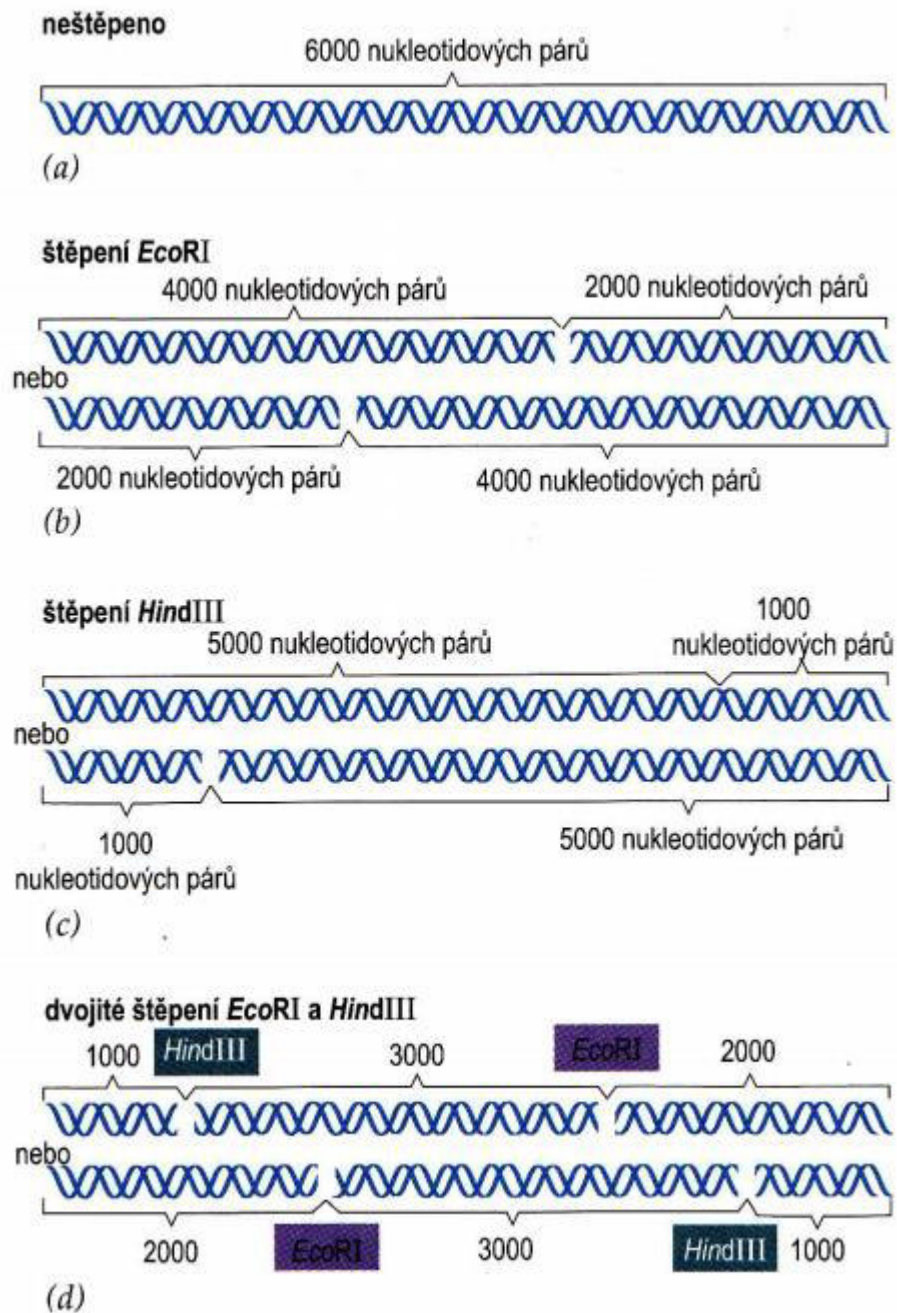
Výsledným produktem PCR jsou amplikony definované velikosti o délce desítky až tisíce bp, kde jeden bp je jeden protilehlý pár bází. Jejich velikost se v reakční směsi obvykle stanovuje gelovou elektroforézou proti délkovým standardům. [32]



Obrázek 2: Schéma průběhu PCR [11]

2.6.2.3 Restrikční analýza pomocí endonukleas

Endorestrikční analýza je provedena enzymaticky pomocí restrikčních endonukleas. Restrikční endonukleasy jsou sekvenčně specifické enzymy, které jsou produkovány většinou kmenů bakterií. Slouží k degradaci cizorodé DNA, například při napadení bakteriofágem. Enzymy se orientují podle rozpoznávacího místa, které je obvykle tvořeno krátkou sekvencí nukleotidů, většinou o čtyřech až osmi nukleotidových jednotkách. Rozštěpení DNA je realizováno hydrolýzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců v místě štěpení. Místo štěpení se nachází uvnitř rozpoznávacího místa, nebo těsně vedle něj. Štěpením vznikají fragmenty DNA, které jsou charakteristické svojí délkou pro jednotlivé taxonomické jednotky systému organismů. [32]



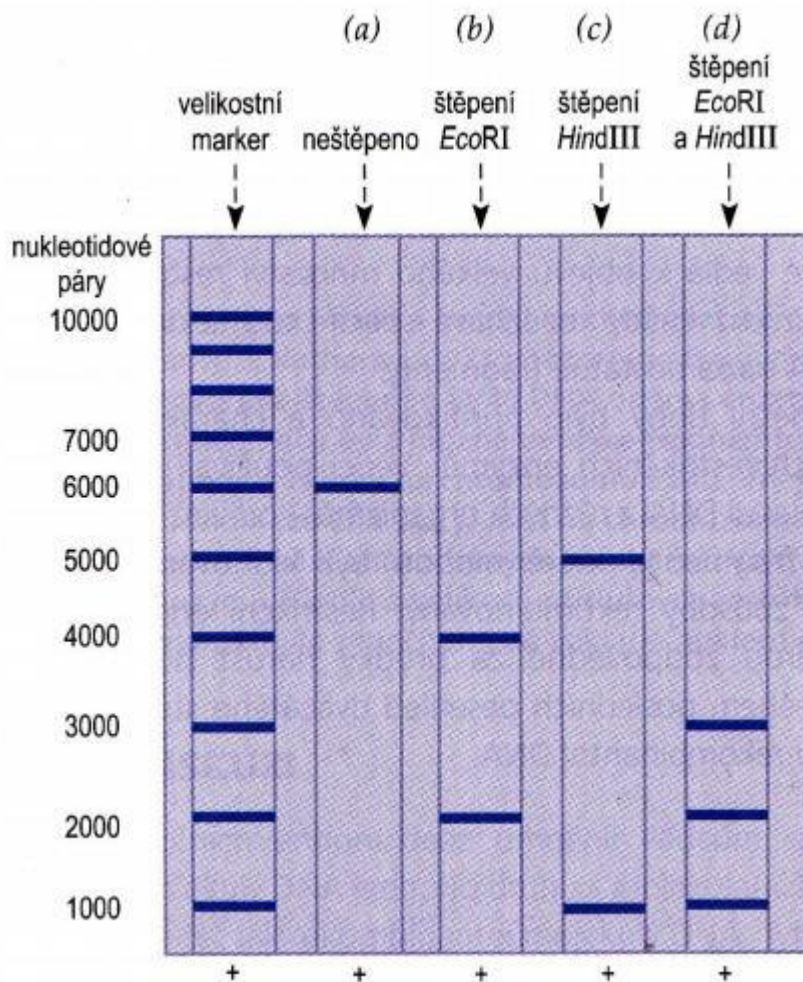
Obrázek 3: Znárodnění průběhu restrikční analýzy. [11]

2.6.2.4 Elektroforetická detekce

Elektroforetická detekce funguje na základě pohybu stanovovaných částic v elektrickém poli. Nukleové kyseliny mají vlivem přítomnosti značného množství fosfátových skupin záporný náboj a jsou tak taženy gelem k anodě. Elektroforetické gely používané k separaci nukleových kyselin bývají polyakrylamidové nebo agarosové. Tyto látky po ztuhnutí vytváří prostorovou polymerní síť s póry. Velikost pórů lze ovlivnit koncentrací gelu. Metodu lze provádět v horizontálním, i ve vertikálním provedení. [5, 32]

Elektroforetická pohyblivost molekul je úměrná logaritmu jejich velikosti, v tomto případě délky molekul, respektive počtu bází v řadě, tedy počtu bp. Stanovované molekuly se přirovnávají k velikostním standardům o známém složení. [32]

Molekuly DNA jsou za normálního stavu průhledné, lze je zviditelnit použitím vhodného barviva. Nejčastěji se používá ethidium bromid, který po ozáření UV světlem fluoreskuje. [32]



Obrázek 4: Schéma elektroforeogramu. [11]

2.6.2.5 Metoda PCR-RFLP

Stanovení polymorfismu je varianta metody PCR, která je specifikovaná pro odlišení jednotlivých druhů. Pro typizaci se používá analýza určitého úseku DNA, ve kterém se objevuje vhodná míra změn mezi určovanými taxony. [32]

Pro analýzu kvasinek je upřednostňovaný segment 5,8S-ITS, který vymezují primery ITS1 a ITS4. Pomocí PCR může být potom tento segment vhodně amplifikovaný. Produkt PCR pak štěpí specifické restriční endonukleasy. Výsledné fragmenty jsou následně děleny na agarosovém gelu pomocí elektroforézy. Podle velikostí restričních fragmentů je pak možno kvasinky druhově odlišit. Za účelem spolehlivého rozlišení je vhodné použít více než jednu restriční endonukleasu. [34]

Výhodou této metody je finanční a časová nenáročnost, výsledky jsou snadno opakovatelné, a interpretovatelné. Metodu lze použít k identifikaci kvasinek z různých zdrojů, často se jedná o výzkum vinných kvasinek nebo kvasinek z jiných potravin. Díky rychlosti

metody je možné v průběhu fermentace sledovat složení kvasinek a tím i regulovat proces výroby potravin. [34]

2.6.2.6 Fyzické mapy molekul založené na štěpných místech restričních enzymů

Výsledky této metody lze využít k taxonomickému řazení organismů, respektive k tvorbě fyzických map chromosomů. Tyto mapy jsou velmi přínosné v dalších výzkumech izolace a identifikace fragmentů DNA, které nesou geny nebo jiné významné sekvence. Restričního mapování společně s dalšími molekulárně biologickými metodami lze využít k vytvoření celých genomů jednotlivých organismů. V medicíně se analýza shluků používá k identifikaci nemocí a jejich stádia. [5]

Elektroforetické výsledky fragmentů restričních endonukleas lze zpracovat elektronicky v programu BioNumerics. Program je schopen s žádanou přesností vyhodnotit elektroforeogramy a dále vytváří na základě shlukové analýzy dendrogramy genetické podobnosti identifikovaných kvasinek. [35]

Analýza shluků kvasinek je vhodná k rozčlenění většího množství proměnných do tříd, čili shluků podle jejich podobnosti. Rozčlenění na shluky probíhá vždy pouze s ohledem na některá kritéria. V programu BioNumerics se jedná o velikosti označených fragmentů na elektroforetických gelech. Ve výsledku mají nejvíce podobné taxony k sobě nejbližší. Tak vzniká grafické zobrazení hierarchicky uspořádaných výsledků ve formě dendrogramů. [35]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy

K analýze byly použity sbírkové kvasinky ze Sbírký kultur kvasinek, která je součástí Chemického ústavu Slovenské akademie věd v Bratislavě. Kvasinky jsou v práci uváděny pod pracovním označením.

Tabulka 4: Vybrané sbírkové kvasinky použité pro stanovení lipolytické aktivity

Pracovní označení	Číslo kmene	Rod a druh	Původ
1	013-003-001	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Francie
2	013-004-002	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Jezero s čistou vodou, Slovensko
17	039-004-002	<i>Pichia fermentans</i>	podmáslí, Nizozemí
19	041-006-009	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Mouka z bavlníkových semen
20	041-006-012	<i>Debaryomyces hansenii</i>	List z vlašského ořešáku, Severní Korea
30	017-003-018	<i>Cryptococcus saitoi/friedmanii</i>	Voda z řeky Moravy, Slovensko

3.2 Použité chemikálie

- 10× Taq pufr pro PCR mix (Kapa Biosystems, USA)
- Agar, kvasniční extrakt (HiMedia Laboratories Limited Mumbai, Indie)
- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva Biotech, Německo)
- Délkový standard 20 bp (Takara Bio Inc., Japonsko)
- Délkový standard 100 bp (Elizabeth Pharmacon s. r. o., ČR)
- dNTP mix (Kapa Biosystems, USA)
- Ethanol bezvodý pro UV spektrometrii – C₂H₅OH (Mach chemikálie s. r. o., ČR)
- Ethidium bromid (Serva Biotech, Německo)
- Komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon)
- Kyselina propionová (Raechim, Rusko)
- Nanášecí pufr Loading buffer (Fermentas, Litva)
- Parafínový olej
- Primery ITS1, ITS4 (Kapa Biosystems, USA)
- Quant-iT™ ds DNA HS Assay Kit 0,2 – 100 ng
- Restrikční endonukleasy – *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*, *TaqI*^α (BioLabs, TaKaRa)
- Sladina (pivovar Starobrno s.r.o., ČR)
- Sterilní a deionizovaná voda
- Taq DNA polymeráza (Kapa Biosystems, USA)
- CH₃COONa, EDTA, H₃BO₃, HCl, NaOH, Na₂CO₃, Tris
- SpiritBlue Agar
- Řepkový olej

3.3 Přístroje a pomůcky

- Bakteriologické kličky
- Centrifuga Eppendorf 5430 R (Eppendorf AG, Německo)
- Elektroforetická vana Owl separation systeme, model B1, B2, D3 (Biotech s.r.o., ČR)
- vodováha

- Exsikátor se sníženým tlakem
- Laboratorní sklo
- Uzavíratelné plastové mikrozkušavky (FL Medical, Itálie; MO BIO Laboratories, Inc., USA)
- Lednice a mrazák k uchování vzorků DNA
- Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR)
- Mikropipety pipet4u (AHN Biotechnologie GmbH, Německo)
- Špičky k mikropipetám
- Mikrovlnná trouba ETA 1195 (ETA, ČR)
- Plastové uzavíratelné mikrozkušavky
- Minicentrifuga National LABNET C – 1200 (Biotech s.r.o., ČR)
- NanoPhotometer™ UV/Vis (Implen GmbH, Mnichov, Německo)
- Parafilm (American Nacional Can™, USA)
- PCR box AURA MINI (Bioair instruments, Itálie)
- Plastové Petriho misky
- Zkušavky s vatovými zátkami
- Předvážky EK-600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Sušárna (Binder, Německo)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci
- Termocyklér PTC-100™, (MJ Research, Inc, USA)
- Termostat IP 100-U (LTE SCIENTIFIC, Velká Británie) •
- Transluminátor (Ultra Lum. Inc, USA)
- Vortex LABNET VX 100 (Biotech s.r.o., ČR)
- Vortex-Genie 2, MO Bio (Biotech s.r.o., ČR)

3.4 Kultivační média a použité roztoky

3.4.1 Příprava kultivačního média ke kultivaci sbírkových kvasinek

Ke kultivaci sbírkových kvasinek bylo použito sladidové medium. Sladina byla získána z pivovaru Starobrnno, kde se vyrábí enzymatickým zpracováním ječného sladu a jeho extrakcí ve vodě. Pro laboratorní použití byla tato sladina naředěna sterilní destilovanou vodou na stupeň cukernatosti 7 °ČSN. Následně bylo uhličitanem sodným upraveno pH roztoku na 6,8. Roztok byl následně rozlit do Erlenmayerových baněk a doplněn agarosou na koncentraci 1 - 3 hm. %. Vzniklá směs byla promíchána a sterilizována v autoklávu po dobu 20 minut. Sterilní medium bylo nalito do Petriho misek a jako šikmý agar do zkušavek.

3.4.2 Stanovení lipolitické aktivity

Ve 400 ml sterilní destilované vody bylo rozpuštěno 12,86 g prášku Spirit Blue Agar. Vzniklá směs byla promíchána a sterilizována v autoklávu po dobu 20 minut. Sterilní roztok byl rozlit po 15 ml do zkušavek, do každé zkušavky bylo přidáno 0,45 ml oleje. Roztoky byly znovu povařeny a přelity do Petriho misek.

3.4.3 Příprava 10×TBE pufru

Pro přípravu zásobního roztoku TBE pufru byl nejdříve nachystán 0,5 mol·l⁻¹ roztoku EDTA tak, že bylo naváženo 9,36 g EDTA. Navážené množství bylo převedeno do kádinky, bylo přidáno 20 ml destilované vody a upraveno pH na hodnotu 8 koncentrovaným roztokem NaOH. Tato směs byla 30 minut rozmíchávána na elektrické míchače do úplného rozpuštění

EDTA. Tento roztok byl převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a byl doplněn po rysku destilovanou vodou. Z promíchaného roztoku bylo odebráno 40 ml a nalito do 1 000 ml odměrné baňky. K roztoku bylo dále přidáno 108 g Tris a 55 g H₃BO₃. Po rozpuštění byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku.

3.4.4 Příprava 1×TBE pufru

Pro přípravu 1×TBE pufru, který byl použit k přípravě gelů pro elektroforetickou detekci DNA fragmentů, bylo ze zásobního roztoku odebráno 100 ml do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku. Pro přípravu vodivostního pufru pro elektroforézu bylo k 100 ml 1×TBE pufru přidáno 100 µl roztoku Ethidium bromidu.

3.4.5 Příprava délkových standardů 100 bp a 20 bp

Délkový standard 100 bp byl dodán v připravené formě. Na gel byl nanášen v objemu 3 µl. Délkový standard 20 bp byl připraven podle dodávaného návodu následujícím způsobem. Bylo smícháno 2,5 ml 20 bp DNA, 2,5 ml sterilní destilované vody a 1 ml nanášecího pufru dodávaného společně s 20 bp DNA. Takto připravený délkový standard byl aplikován na gel po 6 µl.

3.4.6 Příprava 2% agarózového gelu

Pro elektroforetickou detekci DNA fragmentů byl použit 2% agarózový gel připravený z 2 g agarózy smíchané se 100 ml 1×TBE pufru v Erlenmayerově baňce. Směs byla opakovaným varem v mikrovlnné troubě dokonale homogenizována.

3.4.7 Příprava 80% ethanolu

12,5 ml 96% ethanolu bylo smícháno s 250 µl destilované vody a výsledný roztok byl skladován při -20°C.

3.4.8 Příprava PCR směsi

PCR směs pro jeden vzorek DNA byla připravena smícháním následujících PCR komponent v množství uvedeném v tabulce 5.

Tabulka 5: PCR komponenty pro přípravu PCR směsi

PCR komponenty	Objem [µl]
sterilní voda	128,7
pufr	15
dNTP mix	3
primer ITS1	0,6
primer ITS4	0,6

K celkovému množství 147,9 µl připravené směsi bylo přidáno 1,5 µl templátové DNA a 0,6 µl termostabilní Taq polymerázy. Negativní kontrola byla připravena stejným způsobem, ale místo templátové DNA bylo k reakční směsi přidáno 1,5 µl sterilní vody.

3.5 Pracovní postupy

3.5.1 Restrikční analýza

Pro provedení restrikční analýzy byly kvasinky kultivovány na sladinném agaru, DNA kultur byla izolována komerčním setem Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit. Získaná DNA byla amplifikována metodou PCR a získané fragmenty byly štěpeny restrikčními endonukleasami. Získané fragmenty byly podrobeny gelové elektroforéze a vyhodnocovány z elektroforeogramů.

3.5.1.1 Kultivace sbírkových kvasinek

Kvasinky získané ze sbírky CCY Chemického ústavu Slovenské akademie věd byly naočkovány na předem připravený sladinný agar v Petriho miskách a inkubovány při teplotě 26 °C po dobu tří dnů. Narostlé kultury byly dále použity k izolaci kvasinkových DNA.

3.5.1.2 Izolace DNA

Izolace kvasinkové DNA byla provedena použitím komerčního setu Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit podle příloženého návodu k použití. Do rozbíjecí mikrozkušavky byl pipetován rozbíjecí pufr v objemu 300 µl, ve kterém byly poté rozsuspendovány dvě očkovací očka kvasinkové kultury. K této směsi bylo pipetováno 50 µl roztoku MD1. Mikrozkušavky byly vloženy v horizontální poloze do adaptéru vortexu a 10 minut vortexovány při maximální rychlosti. Poté byla směs v mikrozkušavkách centrifugována 1 minutu při 10000 otáčkách a teplotě 4 °C (všechny další centrifugace během izolace byly prováděny za stejných podmínek). Přibližně 350 µl supernatantu bylo přeneseno do čisté mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 100 µl roztoku MD2. Tato směs byla krátce promíchána na vortexu a inkubována 5 minut při teplotě 4 °C. Poté byla směs centrifugována a získaný supernatant (přibližně 450 µl) byl opět přenesen do čisté mikrozkušavky a k němu bylo přidáno 900 µl roztoku MD3 a směs byla krátce zvortexována. 700 µl takto připravené směsi bylo pipetováno na kolonku a centrifugováno. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a na kolonku byl pipetován zbytek směsi a opět zcentrifugováno. Přefiltrovaný roztok byl opět odstraněn a na tutéž kolonku bylo přidáno 300 µl roztoku MD4 a kolonka byla centrifugována. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a kolonka ještě jednou centrifugována. Kolonka byla poté opatrně přenesena do čisté mikrozkušavky a do středu bílé membrány kolonky bylo pipetováno 50 µl roztoku MD5 a zcentrifugováno. Kolonka byla odstraněna a roztok DNA v mikrozkušavce byl pro další použití uchován při – 20°C. [36]

3.5.1.3 PCR

Z připravené PCR směsi bylo pipetováno 147,9 µl do mikrozkušavky Eppendorf o objemu 0,5 ml a k tomuto množství bylo přidáno 1,5 µl izolované DNA a 0,6 µl Taq polymerázy. Směs byla mírně zvortexována a vložena do termocykléru. V termocykléru byla templátová DNA namnožena polymerázovou řetězovou reakcí podle teplotního a časového profilu uvedeného v tabulce 6. K amplifikaci v oblasti 5,8S-ITS rDNA byly použity primery ITS1 a ITS4, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 7. Negativní kontrola byla připravena stejným způsobem, ale místo templátové DNA bylo k reakční směsi přidáno 1,5 µl sterilní vody. [36]

Tabulka 6: Teplotní a časový profil průběhu PCR

krok	Teplota [°C]	Čas [min]
Počáteční denaturace	94	4

25 cyklů	Denaturace	94	1
	Připojení primerů	48	0,5
	Polymerace	72	1
Elongace		72	10

Tabulka 7: Použité primery a jejich sekvence

Primer	Sekvence
ITS1	5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'
ITS4	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'

3.5.1.4 Přečištění PCR produktu

PCR produkt je potřeba před restrikční analýzou přečistit. 20 µl amplifikované DNA bylo smícháno s 2 µl octanového pufru. Směs byla krátce zvortexována a ke směsi bylo přidáno 60 µl 96% ethanolu, který byl vychlazen na teplotu – 20°C. Tato směs se poté centrifugovala 30 minut při 4°C a 14 000 otáčkách. Supernatant byl dekantován a přebytečný roztok byl slit. K supernatantu bylo do mikrozkušavky pipetováno 60 µl 80% roztoku ethanolu a obsah byl opět centrifugován při stejných podmínkách. Centrifugací byl supernatant opět dekantován, ethanol byl opět slit a sediment v mikrozkušavkách byl vysušen během 30 minut v exsikatoru.

3.5.1.5 Restrikční analýza

K přečištěné DNA bylo pipetováno 13,4 µl sterilní vody, 1,5 µl pufru a 0,1 µl restrikčního enzymu. Použitá množství jednotlivých složek byla zvolena na základě doporučení od výrobců a předchozích zkušeností. Připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 16 hodin a na závěr byla teplota zvýšena na teplotu denaturace enzymu na 20 minut. Vlastnosti jednotlivých restrikčních endonukleáz, které byly pro taxonomické zařazení kvasinek použity, jsou uvedeny v tabulce 8. Restrikční fragmenty byly poté podrobeny elektroforetické detekci.

Tabulka 8: Vlastnosti použitých restrikčních endonukleas

Označení enzymu	Producent enzymu	Rozpoznávací místo na sekvenci DNA		T _{inkubace} [°C]	T _{inaktivace} [°C]
		5' → 3'	3' ← 5'	16 hodin	20 minut
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	GG↓CC	CC↑GG	37	80
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	C↓ATC	CTA↑G	37	80
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	GCG↓C	C↑GCG	37	80
<i>TaqI</i> ^a	<i>Thermus aquaticus</i>	T↓CGA	AGC↑T	37	80

3.5.1.6 Elektroforetická detekce PCR produktů a restrikčních fragmentů

PCR produkty i restrikční fragmenty byly detekovány pomocí horizontální elektroforézy na 2% agarózovém gelu. Podle počtu analyzovaných vzorků byly použity různé velikosti elektroforetických van. Gel na velkou vanu (50 jamek) byl připraven v objemu 100 ml, gel na střední vanu (20 jamek) v objemu 60 ml a na malou vanu (14 jamek) v objemu 40 ml. Ke gelu byl přidán ethidium bromid v objemu odpovídajícím 1/10000 objemu gelu.

Vzorky byly na gel nanášeny tak, že byl smíchán 1 µl nanášecího pufru s 5 µl vzorku a 5 µl této směsi bylo pipetováno do jamky na gelu. Negativní kontrola u PCR byla nanášena stejným způsobem. Pozitivní kontrola k restrikční analýze byla provedena tak, že byl nanášen PCR produkt shodující se s délkou amplikonu, který byl pro restrikční analýzu použit. Do okrajových jamek na gelu byl nanášen délkový standard 100 bp pro detekci PCR produktů

v objemu 3 μl . Pro detekci restrikčních fragmentů byl použit délkový standard 100 bp v uvedeném množství i délkový standard 20 bp v objemu 6 μl .

Dělení fragmentů probíhalo ve velké elektroforetické vaně 3 hodiny při konstantním napětí 60 V. Ve střední vaně probíhala detekce při konstantním napětí 55 V 3 hodiny a v malé vaně při konstantním napětí 55 V po dobu 2,5 hodin.

Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do transluminátoru a pod UV světlem byl gel vyfotografován nainstalovanou kamerou a snímek byl uložen do počítače pro pozdější zpracování.

3.5.2 Kultivace na SpiritBlue Agar

Kvasinky byly naočkovány na předem připravený sterilní SpiritBlue Agar. Následně byly kultivovány po dobu dvou dnů při teplotě 26 °C. Po dvou dnech kultivace byla vyhodnocena ztráta modré barvy a výsledky zaznamenány fotoaparátem.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Příprava izolované DNA ze sbírkových kvasinek a amplifikace pomocí PCR

Sbírkové kvasinky byly naočkovány na sladidinový agar a po kultivaci odebrány vzorky kolonií k izolaci DNA.

Izolace byla provedena pomocí komerčního setu Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit. Tento postup byl zvolen z důvodu vysokých nároků na čistotu, rychlost a jednoduchost. Koncentrace vyizolované DNA se pohybovala v rozmezí 10 až 100 ng·μl⁻¹. Vyizolovaná DNA byla následně uchovávána v mrazicím boxe při teplotě -20°C a použita k amplifikaci a restrikční analýze.

DNA byla amplifikována metodou PCR s použitím primerů ITS1 a ITS4. Produkty byly následně detekovány na 2% agarosovém gelu a byla odečtena jejich velikost pomocí délkového standardu 100 bp. Byla zjištěna délka fragmentů v rozmezí 450 – 740 bp. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 9.

Tabulka 9: Zjištěné velikosti produktů PCR

Pracovní označení	Druh kvasinky	Velikost PCR produktu [bp]
1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	740
2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	740
17	<i>Pichia fermentans</i>	450
19	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650
20	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650
30	<i>Cryptococcus saitoi/friedmanii</i>	630

4.2 Výsledky detekce produktů restrikční analýzy

Naamplifikované úseky DNA byly přečištěny etanolem podle uvedeného postupu a poté podrobeny restrikční analýze. Byly použity čtyři endonukleasy, *HaeIII*, *HinfI*, *HtaI* a *TaqI*^a. U každého enzymu a každé kvasinky byly zjištěny délky jednotlivých fragmentů podle délkových standardů 100 bp a 20 bp.

4.2.1 Restrikční endonukleasa *HaeIII*

Restrikční endonukleasa *HaeIII* má rozpoznávací místo pro sekvenci 5'...CC↓GG...3'. Velikosti fragmentů, které byly odečteny z elektroforeogramů a jsou uvedeny v tabulce 10.

Z výsledků je vidět, že vzorky číslo 1, 2, 17 a 18 obsahovaly 2 fragmenty, vzorek číslo 20 tři fragmenty a vzorek č. 6 jeden fragment. Vzorky číslo 1 a 2 se na elektroforeogramu jeví jako totožné. U vzorků číslo 19 a 20 vidíme, že velikost PCR produktu je stejná, avšak štěpení restrikčních endonukleas proběhlo v jiných místech.

Tabulka 10: Velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktů kvasinek izolovaných ze vzorků restriční endonukleasou *HaeIII*

Pracovní označení	Druh kvasinky	Velikost PCR produktu [bp]	Naštěpené fragmenty [bp]
1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	740	550 + 50
2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	740	550 + 50
17	<i>Pichia fermentans</i>	450	350 + 80
19	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	440 + 140
20	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	310 + 210 + 40
30	<i>Cryptococcus saitoi/friedmanii</i>	630	neštěpí

4.2.2 Restriční endonukleasa *HinfI*

Restriční endonukleasa *HinfI* má rozpoznávací místo pro sekvenci 5'...G↓ATC...3'. Velikosti fragmentů byly odečteny z elektroforeogramů a zapsány do tabulky 11.

Z výsledků je vidět, že vzorek č. 1 a 2 *Kluyveromyces lactis* obsahoval 6 fragmentů. Zbylé vzorky obsahovaly dva fragmenty. Vzorky 19 a 20 byly štěpeny v polovině produktu PCR.

Tabulka 11: Velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktů kvasinek izolovaných ze vzorků restriční endonukleasou *HinfI*

Pracovní označení	Druh kvasinky	Velikost PCR produktu [bp]	Naštěpené fragmenty [bp]
1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	740	250 + 180 + 115 + 80 + 65 + 50
2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	740	250 + 180 + 115 + 80 + 65 + 50
17	<i>Pichia fermentans</i>	450	250 + 200
19	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	325+325
20	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	325+325
30	<i>Cryptococcus saitoi/friedmanii</i>	630	370 + 260

4.2.3 Restriční endonukleasa *HhaI*

Restriční endonukleasa *HhaI* má rozpoznávací místo pro sekvenci 5'...GCG↓C...3'. Velikosti fragmentů byly odečteny z elektroforeogramů a zapsány do tabulky 12.

Vzorky č. 1a 2 obsahovaly 4 shodně dlouhé fragmenty. Vzorek *Pichia ferentans* při analýze touto restriční endonukleasou vykazuje také 4 fragmenty. Vzorky *Debaromyces hansenii* č. 19 a 20 se dvěma fragmenty při analýze touto restriční endonukleasou jeví jako shodné. Vzorek č. 6 byl tímto enzymem štěpen na dva fragmenty.

Tabulka 12: Velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktů kvasinek izolovaných ze vzorků restrikční endonukleasou *HhaI*

Pracovní označení	Druh kvasinky	Velikost PCR produktu [bp]	Naštěpené fragmenty [bp]
1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	740	285 + 190 + 168+90
2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	740	285 + 190 + 168+90
17	<i>Pichia fermentans</i>	450	165 + 100 +100+ 75
19	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	340 + 310
20	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	340 + 310
30	<i>Cryptococcus saitoi/friedmanii</i>	630	330 + 300

4.2.4 Restrikční endonukleasa *TaqI*^a

Restrikční endonukleasa *TaqI*^a má rozpoznávací místo pro sekvenci 5'...T↓CGA...3'. Velikosti fragmentů byly odečteny z elektroforeogramů a zapsány do tabulky č. 13.

Z výsledků je vidět, že vzorky *Kluyveromyces lactis* č. 1 a 2 obsahovaly 3 shodné fragmenty. Vzorek číslo 17 byl dělen na 3 fragmenty. Vzorek č. 19 byl štěpen na 5 fragmentů. U vzorků číslo 19 a 20 vidíme, že velikost PCR produktu je stejná, avšak štěpení restrikčních endonukleas proběhlo v jiných místech. Při porovnání délek jednotlivých fragmentů je zřejmé, že u vzorku č. 20 zůstal fragment o délce 320 vcelku, zatímco u vzorku č. 19 byl štěpen na délky 220 a 90. Vzorek č. 30 byl štěpen na dva fragmenty.

Tabulka 13: Velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktů kvasinek izolovaných ze vzorků restrikční endonukleasou *TaqI*^a

Pracovní označení	Druh kvasinky	Velikost PCR produktu [bp]	Naštěpené fragmenty [bp]
1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	740	300 + 250 + 190
2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	740	300 + 250 + 190
17	<i>Pichia fermentans</i>	450	190 + 130 + 130
19	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	280 + 220 + 90 + 40 + 20
20	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	320 + 290 + 40
30	<i>Cryptococcus saitoi/friedmanii</i>	630	400 + 230

4.3 Test lipolytické aktivity

Aktivita lipáz vybraných sbírkových kvasinek byla stanovována v Petriho miskách kultivací na SpiritBlue Agar. Působením lipáz se mění pH agarů a modré zbarvení se ztrácí.

4.3.1 Příprava kultivace na SpiritBlue Agar

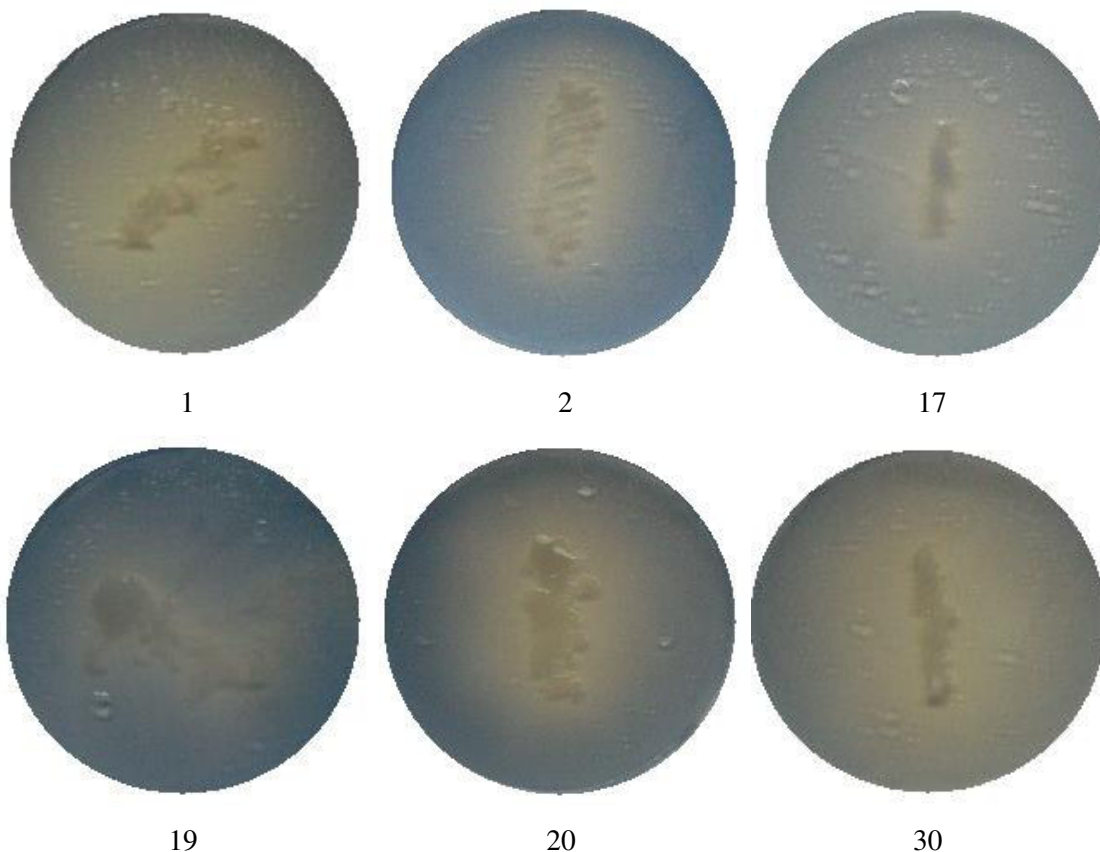
SpiritBlue agar byl připraven z prášku podle výše uvedeného postupu. Na sterilní medium byly naočkovány jednotlivé sbírkové kvasinky a po dvou dnech kultivace byly zaznamenány výsledky na fotoaparát.

4.3.2 Výsledky lipolytické aktivity

Všech šest sledovaných vzorů kvasinek projevilo v provedeném testu lipolytickou aktivitu, SpiritBlue agar se v okolí kvasinkových kolonií vlivem štěpení lipidů odbarvil. Tabulka 15 zobrazuje výsledky lipolytického testu.

Tabulka 14: Výsledky testu lipolytické aktivity

Pracovní označení	Druh kvasinky	Důkaz lipolytické aktivity	Poznámka
1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ano	Vysoká aktivita
2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ano	Nízká aktivita
17	<i>Pichia fermentans</i>	Ano	Nízká aktivita
19	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Ano	Nízká aktivita
20	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Ano	Vysoká aktivita
30	<i>Cryptococcus saitoi/friedmanii</i>	Ano	Vysoká aktivita



Obrázek 5: Výsledky lipolytického testu

5 Závěr

První část této bakalářské práce se zaměřuje na biologii kvasinek a metabolismus, v rámci něj byly popsány i lipolytické vlastnosti kvasinek. Významnou kapitolu tvoří výskyt kvasinek v našem životním prostředí a v potravinách. Zvláštní kapitola byla věnována také technologickému využití kvasinek, jakožto velice významného prvku dnešních moderních technologií. Druhá část se zabývá způsoby identifikace kvasinek, a to jak na základě fyziologických vlastností, tak na základě metod molekulární biologie. Zejména metoda PCR-RFLP a dále stanovení lipolytické a proteolytické aktivity.

V práci bylo použito šest vzorků kvasinek ze sbírky mikroorganismů CCY Slovenské akademie věd. Metodou PCR-RFLP byly analyzovány dva vzorky kvasinky *Kluyveromyces lactis*, dva vzorky kvasinky *Debaromyces hansenii* a po jednom vzorku kvasinky *Pichia fermentans* a *Cryptococcus saitoi/friedmanii*.

- DNA vzorků byla izolována a k amplifikaci byla zvolena oblast 5,8S-ITS pomocí primerů ITS1 a ITS4. Amplifikovaná DNA byla přečištěna a následně použita k restrikční analýze za použití čtyř enzymů, *HaeIII*, *HinfI*, *HtaI* a *TaqI*^a. Výsledky restrikční analýzy byly vyhodnoceny délek jednotlivých fragmentů.
- Zkoumané kvasinky byly také podrobeny testu lipolytické aktivity na SpiritBlue agaru. Zde všechny vzorky vykazovaly pozitivní reakci.

Výsledky této práce budou sloužit k rozšíření databáze kvasinek Fakulty chemické VUT v Brně. Budou využity při dalších zkoumáních kvasinek zejména v oblasti izolace a identifikace vzorků potravin a z prostředí.

Literatura

- [1] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDO VÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999, 108 s. ISBN 80-718-4990-1.
- [2] WALKER, Graeme M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 1998. ISBN 04-719-6446-8.
- [3] ATLAS, Ronald M. *Microorganisms in our world*. St. Louis, MO: Mosby-Year Book, c1995, xix, 765 p. ISBN 0-8016-7804-8.
- [4] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361 s. ISBN 80-856-0571-6.
- [5] BETINA, Vladimír. *Mikrobiológia*. 1. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita v Bratislave, 1995, s. 1-207. ISBN 80-227-0755-4.
- [6] HUDECOVÁ, Daniela a Viktor MAJTÁN. *Mikrobiológia I*. 1. vyd. Bratislava: STU, 2002, 189 s. ISBN 80-227-1663-4.
- [7] ŠIPICKÝ, Matej a Július ŠUBÍK. *Genetika kvasiniek*. 1. vyd. Bratislava: Veda, 1992, 315 s. ISBN 80-224-0396-2.
- [8] BURSOVÁ, Šárka, Lenka NECIDO VÁ a Marta DUŠKOVÁ. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, 114 s. ISBN 978-80-7305-741-1.
- [9] KLABAN, Vladimír. *Svět mikrobů: malý mikrobiologický slovník*. Hradec Králové: Gaudeamus, 1999, 303 s. ISBN 80-704-1639-4.
- [10] KLABAN, Vladimír. *Ekologie mikroorganismů: ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů*. 1. vyd. Praha: Galén, c2011, ix, 549 s. ISBN 978-807-2627-707.
- [11] SNUSTAD, D a Michael J SIMMONS. *Genetika*. Vyd. 1. Editor Jiřina Relichová. Překlad v Brně, 1999. ISBN 80-214-1305-0.
- [12] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. 1990. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 699 s., [72] s. obr. příl. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.
- [13] *MiniAtlas mikroorganismů* [online]. cit [2015-07-05]. Dostupné z WWW: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/>
- [14] ADAMS, M. R. a M. O. MOSS. *Food Microbiology*. 2nd Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000, 479 s. ISBN 08-540-4611-9.
- [15] VISHNIAC, H. S. 1985. *Cryptococcus friedmannii*, a New Species of Yeast from the Antarctic. *Mycologia*. **77**(1). DOI: 10.2307/3793260.
- [16] Yeasts 2011. 2011. GROENEWALD, Dr. Marizeth (ed.). *CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center: An institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences* [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database>
- [17] STEIDL, Robert. 2002. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 1. Valtice: Národní salon vín, 307 s. ISBN 80-903-2010-4.

- [19] MARSHALL, Robert T. 1992. *Standard methods for the examination of dairy products*. 16th Ed. Washington: American Public Health Association, 546 s. ISBN 08-755-3211-X.
- [20] GHOLAMNEJAD, Jalal a Hasan Reza ETEBARIAN. Effect of calcium chloride on the biocontrol efficacy of two antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple fruit. ISBN 10.1007/s12600-009-0033-8.
- [21] ONOFRI, S., L. SELBMANN, G.S. de HOOG, M. GRUBE, D. BARRECA, S. RUISI, L. ZUCCONI, John G. FLEAGLE a Derek ROFF. *Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life: The Life on an RNA Virus (MWV35)*. ISBN 10.1007/978-1-4613-8666-7_13.
- [22] LOPERENA, Lyliam, Verónica SORIA, Hermosinda VARELA, Sandra LUPO, Alejandro BERGALLI, Mairan GUIGOU, Andrés PELLEGRINO, Angela BERNARDO, Ana CALVIÑO, Federico RIVAS a Silvia BATISTA. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, vol. 28, issue 5, s. 2249-2256. DOI: 10.1007/s11274-012-1032-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-012-1032-3>
- [23] PELIKÁN, Miloš, František DUDÁŠ a Drahomír MÍŠA. *Technologie kvasného průmyslu*. 1. vyd. Brno: MZLU, 1996, 129 s. ISBN 80-715-7240-3.
- [24] AHANSAL, Lahcen, Abdelhadi BEN SASSI, Alessandro MARTINI, Anne VAUGHAN-MARTINI, Graeme WALKER a Abdellatif BOUSSAID. Biodiversity of yeasts isolated from the indigenous forest of Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) in Morocco. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, vol. 24, issue 6, s. 777-782. DOI: 10.1007/s11274-007-9532-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-007-9532-2>
- [25] PAVELKA, Antonín. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. 1. vyd. Praha: Litera, 1996, 105 s. ISBN 80-857-6309-5.
- [26] ROBERT T. MARSHALL, Robert T.editor. *Standard methods for the examination of dairy products*. 16th ed. 1992. Washington, DC: American Public Health Association, 1993, 105 s. ISBN 08-755-3210-1.
- [27] TOFALO, Rosanna, Giuseppe FASOLI, Maria SCHIRONE, Giorgia PERPETUINI, Alessia PEPE, Aldo CORSETTI a Giovanna SUZZI. 2014. The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **187**: 41-49 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.029. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051400316X>
- [28] JAKOBSEN, Mogens a Judy NARVHUS. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal* [online]. **6**(8-9): 755-768 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/0958-6
- [29] CAPECE, A. a P. ROMANO. 2009. "Pecorino di Filiano" cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **132**(2-3): 180-184 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.007. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816050900213X>

- [30] BINETTI, A., M. CARRASCO, J. REINHEIMER a V. SUÁREZ. 2013. Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **115**(2): 434-444 [cit. 2015-05-08]. DOI: 10.1111/jam.12228. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12228>
- [31] VRANÁ, Dagmar a Anna KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ. 1986. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. Vyd. 1. Praha: Academia, 375 p.
- [32] ŠMARDA, Jiří, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladoslava RŮŽIČKOVÁ, Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno. Masarykova univerzita, 2008, 190 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [33] TELLIER, Raymond, Jens BUKH, Suzanne U. EMERSON a Robert H. PURCELL. 2003-8-1. Long PCR Amplification of Large Fragments of Viral Genomes: A Technical Overview. *PCR Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, : 167 [cit. 2015-05-09]. DOI: 10.1385/1-59259-384-4:167. ISBN 1-59259-384-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-384-4:167>
- [34] BOEKHOUT, T a V ROBERT. 2003. *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*. Boca Raton: CRC Press, xxii, 488 p. ISBN 08-493-1926-9
- [35] HODEK, J., OVESNÁ, J. Detekce vnitřního genu rýže fosfolipázy D pomocí PCR. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2007, 16 l. ISBN ř7Ř-80-87011-35-5.
- [36] BENÍČKOVÁ, Romana. SLEDOVÁNÍ VLIVU POUŽITÍ AUTOCHTONNÍ KVASINKY PŘI VÝROBĚ VÍNA V PODMÍNKÁCH VINAŘSTVÍ. Brno, 2014. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=81528. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Mgr. Dana Vránová, PhD.

Zdroje použitých obrázků

- [11] SNUSTAD, D a Michael J SIMMONS. 2009. *Genetika*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, xxi, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [37] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd. Brno: VUT FCH, 2004, 99 s. ISBN 80-214-2567-9.

Seznam použitých zkratek

A	adenin
bp	počet párů bází
C	cytosin
CCY	Culture Collection of Yeasts
ČSN	Československá norma
DNA	deoxyribonukleová kyselina
G	guanin
hm.	hmotnostní
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
T	tymin
UV	ultrafialové
V	volt
VUT	Vysoké učení Technické