

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2017

Bc. Alena Jurnečková



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## BIOTYPIZACE ASKOMYCETNÍCH KVASINEK

BIOTYPING OF ASCOMYCETOUS YEASTS

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Alena Jurnečková

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Stratilová, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1038/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Alena Jurnečková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Eva Stratilová, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Biotypizace askomycetních kvasinek

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Literární přehled k dané problematice
- 2) Optimalizace metod biotypizace askomycetních kvasinek
- 3) Analýza askomycetních kvasinek metodou MALDI-TOF, případně pomocí sekvenace D1/D2 oblastí 26S rRNA.
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

-----  
Bc. Alena Jurnečková  
student(ka)

-----  
Ing. Eva Stratilová, Ph.D.  
vedoucí práce

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

V Brně dne 31.1.2017

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

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu č. APVV-15-0744 – *Zbierka kultúr kvasiniek ako biobanka pre budúce generácie*, ktorý je financovaný Agentúrou na podporu výskumu a vývoja v rámci Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky.

## **ABSTRAKT**

Pro biotypizaci MALDI-TOF bylo vybráno celkem 84 izolátů kvasinek například z vody, rostlin, ovocných plodů nebo půdy. Veškeré kmeny byly kultivovány na sladidlovém agaru a YPD médiu. Vzorky pro biotypizaci byly upraveny podle metody firmy Bruker Daltonik GmbH, Chemického ústavu SAV a kombinací obou těchto metod. Jednotlivé kmeny byly identifikovány na základě analýzy intracelulárních ribozomálních proteinů hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. V případě nejednoznačnosti výsledků byla u daných kmenů vyzolována DNA a sekvenována doména D1/D2 26S rRNA.

Identifikace kmenů byla provedena srovnáním jejich hmotnostních spekter se spektry sekvenovaných kmenů v programu MALDI Biotyper 3.0. Výsledkem byly hodnoty skóre, na jejichž základě byla posouzena vzájemná podobnost kmenů.

Z celkového počtu 84 kmenů, jich 18 bylo předem sekvenováno a sloužily tak jako vzorové kmeny pro porovnání s neznámými izoláty. Dohromady 51 kmenů bylo jednoznačně taxonomicky zařazeno do 18 fylogenetických skupin na úrovni druhu. Pro celkem 6 kmenů byla biotypizace hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF opakována z důvodu nejednoznačnosti výsledků.

U 15 kmenů nebylo taxonomické zařazení jasně určeno, a proto byly navrženy na sekvenaci domény D1/D2 26S rRNA. Pouze jeden kmen z celkového množství nebylo možné na základě sekvenování identifikovat, a proto byla izolace DNA opakována. V případě 8 kmenů byly výsledky sekvenování shodné s původně navrženým taxonomickým zařazením. Naopak zbylých 6 kmenů bylo identifikováno jako jiný druh.

U 20 vybraných kmenů byly stanoveny základní charakteristiky pomocí mikrobiologických metod. Byl pozorován vzhled kolonií na tuhém médiu a také vzhled kultur v tekutém médiu. Dále pak byla stanovena konstanta radiálního růstu a přítomnost ureázy. V neposlední řadě bylo provedeno mikroskopické pozorování buněk a kvasná zkouška na sacharidových médiích.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Askomycetní kvasinky, biotypizace, D1/D2 26S rRNA sekvenace, MALDI-TOF MS

## **ABSTRACT**

In total, 84 yeast strains (originated from water, plants, fruits and soil) were selected for MALDI-TOF biotyping. All strains were cultivated on malt agar and YPD medium. Samples for biotyping were processed according to methods of Bruker Daltonik GmbH company, Institute of Chemistry of SAS and combination of these methods. Single strains were identified based on the analysis of intracellular ribosomal proteins using MALDI-TOF mass spectrometry. In case of ambiguous results, the DNA was isolated and the D1/D2 26S rRNA domain sequencing was performed.

The strain identification was carried out by comparing its mass spectra with spectra of sequenced strains using MALDI Biotyper 3.0 software. The mutual similarity of strains was considered by score value, which was the result of the analysis.

In total, 18 strains from 84 were previously sequenced and used as model strains for comparison with unknown isolates. Altogether 51 strains were definitely taxonomically categorized into 18 phylogenetic groups at the species level. The MALDI-TOF biotyping was repeated for overall 6 strains because of ambiguity of results.

The taxonomic classification of 15 strains was not clearly determined and, therefore, these strains were suggested for D1/D2 26S rRNA domain sequencing. It was not possible to identify one strain, based on the results of sequencing, therefore, the DNA isolation was repeated. In the case of 8 strains, the results were identical with originally designed taxonomic classification. Conversely, the remaining 6 strains were identified as species.

For 20 selected strains the basic characteristics were determined using microbiological methods. The shape of colonies growing on solid medium and appearance of cultures in liquid medium was assessed. Furthermore, the radial growth constant and the presence of urease were determined. Finally the microscopic observation of cells and the fermentation test for carbohydrate substrates were performed.

## **KEY WORDS**

Ascomycetous yeasts, biotyping, D1/D2 26S rRNA sequencing, MALDI-TOF MS

## **BIBLIOGRAFICKÁ CITACE**

JURNEČKOVÁ, A. *Biotypizace askomycetních kvasinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 91 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Stratilová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

*Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce paní Ing. Evě Stratilové, Ph.D., Ing. Renatě Vadkertiové, Ph.D., Bc. Barboře Stratilové a celému kolektivu Chemického ústavu Slovenské akademie vied v Bratislavě za jejich pomoc, podporu a cenné rady při řešení mé diplomové práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za jejich ochotu a trpělivost v rámci mého studia.*

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>11</b>
2.1	Askomycetní kvasinky .....	11
2.1.1	Všeobecná charakteristika a klasifikace .....	11
2.1.2	Struktura buněčné stěny a plazmatické membrány .....	11
2.1.3	Reprodukce .....	12
2.1.4	Aplikace a využití askomycetních kvasinek.....	13
2.2	Vybrané druhy askomycetních kvasinek .....	14
2.2.1	<i>Debaryomyces hansenii</i> (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij (1952).....	14
2.2.2	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> Pijper (1928).....	15
2.2.3	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (Niehaus) Shehata, Mrak & Phaff ex Smith (1984).....	15
2.2.4	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (E. C. Hansen) van der Walt (1971).....	16
2.2.5	<i>Kluyveromyces lactis</i> (Dombrowski) van der Walt (1971) .....	17
2.2.6	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> Pitt & M. W. Miller (1968).....	18
2.2.7	<i>Metschnikowia reukaufii</i> Pitt & M. W. Miller (1968).....	19
2.2.8	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (Wickerham) Kurtzman & M. Suzuki (2010) .....	20
2.2.9	<i>Pichia fermentans</i> Lodder (1932).....	21
2.2.10	<i>Pichia kluyveri</i> Bedford ex Kudryavtsev (1960).....	22
2.2.11	<i>Pichia kudriavzevii</i> Boidin, Pignat & Besson (1965b).....	22
2.2.12	<i>Pichia jadinii</i> (Sartory, R. Sartory, Weill & J. Mey.) Kurtzman (1979).....	23
2.2.13	<i>Saccharomyces bayanus</i> Saccardo (1895).....	24
2.2.14	<i>Saccharomyces pastorianus</i> E. C. Hansen (1904).....	25
2.2.15	<i>Saccharomyces paradoxus</i> Batschinskaya (1914).....	26
2.2.16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen ex E. C. Hansen (1883) .....	27
2.2.17	<i>Torulaspora delbrueckii</i> (Lindner) Lindner 1904 .....	28
2.2.18	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (E. C. Hansen) Kurtzman, Robnett & Basehoar – Powers (2008).....	29
2.2.19	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (Lindner) Guilliermond (1912).....	30
2.3	Metody identifikace kvasinek .....	31
2.3.1	Biotypizace hmotností spektrometrií MALDI-TOF.....	31
2.3.2	Metody molekulární biologie .....	36

Konvenční mikrobiologické metody .....	39
<b>3 CÍL PRÁCE</b>	<b>45</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>46</b>
4.1 Seznam kmenů kvasinek pro biotypizaci .....	46
4.2 Použité přístroje a chemikálie .....	51
4.2.1 Použité přístroje a příslušenství .....	51
4.2.2 Použité chemikálie .....	52
4.2.3 Použité softwarové programy .....	53
4.3 Biotypizace MALDI-TOF .....	54
4.3.1 Příprava kultivačních médií .....	54
4.3.2 Inokulace kvasinek .....	54
4.3.3 Kultivace kvasinek .....	54
4.3.4 Příprava matric pro MALDI-TOF MS .....	55
4.3.5 Metody přípravy a aplikace vzorku na MALDI-TOF desku .....	55
4.3.6 Analýza proteinů MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií .....	56
4.4 Sekvence D1/D2 oblasti 26S rRNA genu .....	57
4.4.1 Seznam kmenů navržených na sekvenaci .....	57
4.4.2 Izolace DNA .....	57
4.4.3 Polymerázová řetězová reakce .....	58
4.4.4 Purifikace PCR produktů .....	59
4.4.5 Analýza PCR produktů pomocí bioanalyzátoru .....	59
4.4.6 Příprava přečištěných PCR produktů na sekvenaci .....	60
4.4.7 Sekvence domény D1/D2 oblasti 26S rRNA .....	60
4.5 Stanovení vybraných charakteristik kvasinek .....	61
4.5.1 Seznam testovaných kmenů kvasinek .....	61
4.5.2 Kvašení .....	61
4.5.3 Stanovení přítomnosti ureázy .....	62
4.5.4 Stanovení konstanty radiálního růstu .....	62
4.5.5 Příprava mikroskopických preparátů a pozorování buněk .....	63
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSE</b>	<b>64</b>
5.1 Biotypizace MALDI-TOF .....	64
5.1.1 Volba kultivačního média a metody přípravy a aplikace vzorku .....	64
5.1.2 Taxonomické zařazení kmenů kvasinek na úrovni druhu .....	66

5.2	Sekvence domény D1/D2 oblasti 26S rRNA genu .....	73
5.3	Stanovení vybraných charakteristik kvasinek.....	76
5.3.1	Kvašení .....	76
5.3.2	Stanovení přítomnosti ureázy .....	78
5.3.3	Stanovení konstanty radiálního růstu .....	78
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ</b>	<b>91</b>

# 1 ÚVOD

V roce 1836 Friedrich Kützing, Theodor Schwann a Charles Cagniard-Latour prokázali, že kvasinky jsou živé organismy a konkrétně je označili za houby. Od toho roku zaznamenala identifikace a klasifikace kvasinek značný vývoj.

Jedním ze stěžejních milníků byl rok 1838, kdy německý biolog Julius Meyen vytvořil rod *Saccharomyces*, do kterého zařadil tři zástupce – *S. cerevisiae*, *S. pomorum* a *S. vini*.

O rok později německý biolog Theodor Schwann poprvé popsal tvorbu askospor. Podrobnější charakteristiku, z hlediska samotného formování askospor, však uvedl až v roce 1867 francouzský mykolog Jules de Seynes. Označení *vřecko* neboli *askus* bylo nicméně uvedeno o deset let dříve anglickým botanikem Milesem Berkeleym.

První, kdo měl významnou roli ve vývoji taxonomie kvasinek a podílel se na celé řadě publikací, byl dánský vědec Emil Christian Hansen, který v roce 1904 vydal dokument obsahující základy systematiky rodu *Saccharomyces*.

V roce 1928 stanovil francouzský botanik Alexandre Guilliermondi kritéria pro identifikaci kvasinek, kterými byly například vzhled vegetativních buněk, přítomnost/absence askospor, jejich počet a tvar a v neposlední řadě také schopnost fermentovat určité sacharidy.

Naprostě zlomové období pro identifikaci a taxonomii kvasinek, které proběhlo mezi roky 1931-1998, bylo téměř „monopolem“ mikrobiologů pocházejících z Nizozemí. Právě v tomto období vydaly Nellie Stelling-Dekker, Harmanna Diddens, N. J. W. Kregger-van Rij a J. Lodder své publikace. Lodder spolu s N. J. W. Kreger-van Rij vydaly v roce 1952 kompletní klasifikaci kvasinek, jako jeden svazek, známou pod názvem *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Současně, ale nezávisle na sobě, vydal ruský vědec Vladimir Kudryavtsev publikaci *Systematika kvasinek* a americký vědec L. J. Wickerham dílo *Taxonomy of Yeasts*.

V roce 1998 byla vydána 4. edice, jejímiž hlavními editory se stali Američané Cletus P. Kurtzman a Jack W. Fell. Kurtzmann spolu s Robnettem studovali sekvenci domény D1/D2 26S rRNA, čímž položili základy pro jednu z nejvyužívanějších metod identifikace kvasinek na úrovni druhu.

Klasické mikrobiologické metody, založené na stanovení fyziologických a morfologických vlastností, jako jsou zkvašování sacharidů, stanovení přítomnosti ureázy nebo posouzení vzhledu kolonií a buněk, se dnes stále využívají, avšak pouze k orientačnímu určení o jaký rod a druh se jedná. Avšak vzhledem ke značné podobnosti a tím náročnější identifikaci určitých kmenů se od 70. let minulého století namísto konvenčních metod dostávají do popředí *metody molekulární biologie*, charakterizující konkrétní sekvence nukleových kyselin DNA a RNA.

V poslední době rapidně narůstá popularita tzv. *biotypizace hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF*, která se postupně stává silným konkurentem metod molekulární biologie díky rychlosti a jednoduchosti provedení analýzy. Získaná spektra intracelulárních, především ribozomálních proteinů, jsou unikátní pro každý mikroorganismus, ať už se jedná o kvasinky, bakterie nebo plísňe a jsou označovány jako tzv. „otisk prstu“ (fingerprint). Vyhodnocení je pak provedeno s využitím dostupné knihovny spekter nebo také manuálně.

Ačkoliv biotypizace disponuje vysokou procentuální úspěšností, není možné některé druhy touto metodou rozlišit a v takovéto situaci naopak převládá izolace DNA/RNA a sekvenování.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Askomycetní kvasinky

#### 2.1.1 Všeobecná charakteristika a klasifikace

Askomycetní kvasinky jsou taxonomicky zařazeny do domény Eukarya, říše Fungi, podříše Dikaria a oddělení Ascomycota, které se rozděluje do tří základních linií – Hemiascomycetes, Euascomycetes a Archiascomycetes. Linie Hemiascomycetes zahrnuje pučící kvasinky a kvasinkovité formy bez konidioforů (fruiting body), zatímco linie Euascomycetes obsahuje vláknité houby produkující askospory uložené v asku. Skupina Archiascomycetes je tvořena například druhy *Schizosaccharomyces pombe* nebo *Taphrina deformans*, které vykazují znaky na pomezí askomycetních a bazidiomycetních kvasinek [1].

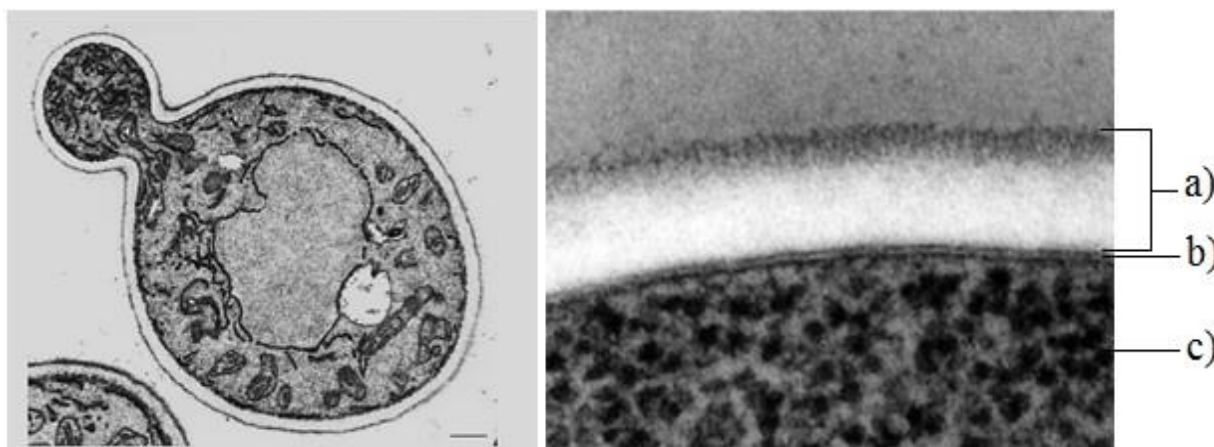
Průmyslově významné rody například *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Torulaspora* nebo *Pichia* jsou konkrétně zařazeny do linie Hemiascomycetes, pododdělení Saccharomycotina, třídy Saccharomycetes a řádu Saccharomycetales [2, 3].

Obvykle se jedná o mezofilní mikroorganismy s teplotním optimem okolo 25 °C. Výjimkou je *Candida psychrophila*, která pro svůj růst vyžaduje maximálně 17 °C a *Issatchenkia orientalis* (anamorfnní forma *Candida krusei*), jejíž teplotní optimum je 45 °C [2].

Přirozený výskyt askomycetních kvasinek je velmi rozmanitý a lze je izolovat například z půdy (*Lipomyces*), slané vody (*Debaryomyces*), vzduchu, povrchu rostlin, ovoce, kůže a intestinálního traktu teplokrevných zvířat a lidí (*Candida albicans*) [4].

#### 2.1.2 Struktura buněčné stěny a plazmatické membrány

Buněčná stěna askomycetních kvasinek je obvykle složena ze dvou základních vrstev – z větší části transparentní vnitřní membrány a vnější membrány, která obsahuje dlouhé fibrily. Vnitřní membrána koresponduje s cytoskeletem buňky a je obvykle tvořena mannoproteiny a polysacharidy. V případě druhu *Saccharomyces cerevisiae* je majoritní složkou buněčné stěny  $\beta$ -1,3-glukan a chitin (**Obr. 1**), u *Schizosaccharomyces pombe* zase  $\alpha$ -1,3-glukan a  $\beta$ -1,3-glukan [5].



**Obr. 1** Struktura buněčné stěny a plazmatické membrány kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (vlevo) [5], detailní pohled na membránové struktury buňky (vpravo) – a) buněčná stěna, b) plazmatická membrána, c) zrníčka glykogenu [8].

Naopak vnější membrána je složena až z dvaceti různých glykoproteinů, které jsou kovalentně vázány k cytoskeletu. V některých případech je buněčná stěna askomycet označována jako třívrstvá, protože v závislosti na kultivačních podmínkách se může dodatečně mezi plazmatickou membránou a vnitřní membránou buněčné stěny vytvořit tmavě zbarvená vrstva, tvořená proteiny [5].

Plazmatická membrána kvasinky *S. cerevisiae* (**Obr. 1**), představuje lipidovou dvojvrstvu o tloušťce 7,5 nm. Hlavními skupinami lipidů, které tvoří plazmatickou membránu, jsou glycerofosfolipidy, sfingolipidy a steroly, které jsou v membráně asymetricky uspořádány. Vnitřní vrstvu membrány tvoří fosfatidylinositol, fosfatidylserin a fosfatidylethanolamin [6].

Součástí plazmatické membrány kvasinek je také ergosterol, který má identickou funkci jako cholesterol v membráně živočišných buněk. Molekuly ergosterolu zajišťují modulaci fluidity a permeability membrány [7].

Kromě lipidů obsahuje plazmatická membrána kvasinek také membránové proteiny, které často zauímají laterální pozici díky spojení s ostatními proteiny, částmi cytoskeletu nebo extracelulární matrix. Obecně se rozlišují proteiny *vnitřní* a proteiny *vnější*, které jsou pouze částečně uloženy v membráně a vyčnívají na jedné straně membrány [6].

### 2.1.3 Reprodukce

Askomycetní kvasinky se mohou rozmnožovat dvěma základními způsoby, buď asexuálně (vegetativně, nepohlavně) nebo sexuálně (pohlavně). Mezi vegetativní způsoby rozmnožování se řadí *pučení* (budding) a *dělení* (fission), ale také formování pseudohýf a septovaného (pravého) mycelia [9].

V rámci pučení u askomycetních kvasinek dominuje tzv. *holoblastické pučení*, kdy se na formování pupenu účastní veškeré vrstvy buněčné stěny mateřské buňky [9].

Pučení lze dále klasifikovat na základě místa, kde pupen vzniká a pro askomycetní kvasinky je typické tzv. *multilaterální pučení*, kdy se pupen netvoří pouze na pólech buňky, ale prakticky na jakémkoliv místě mateřské buňky [9].

Druhým typem nepohlavního rozmnožování je *dělení*, jehož základem je růst přepážky z buněčné stěny uvnitř buňky. Po vytvoření septa se buňky rozdělí za vzniku tzv. *arthrokonidií*. Kromě výše uvedených způsobů rozmnožování mohou askomycetní kvasinky tvořit také *endospory* a *chlamydostry* [9].

V rámci sexuální reprodukce je pro askomycetní kvasinky charakteristická tvorba askospor, které jsou uloženy ve *vřecku* (askus). Obvyklý počet askospor se pohybuje nejčastěji v rozmezí 4 až 8, nicméně askus s jednou nebo dvěma askosporami, stejně jako s vyšším počtem než 8, nejsou výjimkou. Jejich tvary jsou velmi rozmanité od kulovitých, elipsoidních, kloboukovitých až po jehlovité. Také povrch může být různorodý například hladký, drsný nebo s výčnělkem. Samotnému procesu tvorby askospor například v případě *Saccharomyces cerevisiae* předchází změna kultivačních podmínek – nedostatek zdroje dusíku (prolinu) vede nejprve k mitóze a tvorbě pseudohýf. Postupně je však mitotický cyklus při úplné absenci dusíku ukončen v G<sub>1</sub> fázi a je zahájena meióza a sporulace [9, 10].

Askomycetní kvasinky se mohou vyskytovat jak v haploidním, tak i v diploidním stádiu. Existují dva tzv. haploidní *párovací typy* (mating type) – *Mata* a *Mata*, které mohou splýnout v *a/a* diploidní formu. V případě nedostatku nutrientů může tato diploidní forma podléhat

meióze za tvorby askospor. Pokud je daný kmen schopen změny párovacího typu, je pak označen jako *homotalický kmen* a naopak kmeny, u kterých tato změna není možná, jsou nazývány jako *heterotalické* [11].

#### 2.1.4 Aplikace a využití askomycetních kvasinek

Z hlediska průmyslového využití askomycetních kvasinek jasně dominuje druh *Saccharomyces cerevisiae*, jehož kmeny se komerčně používají k výrobě alkoholických nápojů – piva, vína, destilátů a ethanolu, ale také k výrobě droždí. *Saccharomyces cerevisiae* a jiné askomycetní kvasinky jsou mimo jiné významným zdrojem proteinů, vitamínů – především B-komplexu a dále také minerálů a kofaktorů [12].

Zásadní použití má tzv. *kvasničný extrakt*, který je vzhledem k bohatému obsahu aminokyselin, peptidů, nukleotidů a vitamínů, hojně využíván ve farmaceutickém průmyslu, v potravinářském odvětví jako aditivum nahrazující glutámat sodný a především v mikrobiologii jako jedna ze základních složek kultivačních médií [12].

Své uplatnění nachází kvasinky také v procesu tzv. *bioremediace*, kdy se rostliny a mikroorganismy podílejí na dekontaminaci životního prostředí [12].

V medicíně slouží kvasinky jako modelový organismus pro studium regulace buněčného cyklu, apoptózy nebo genetiky nádorových onemocnění [12].

V oblasti molekulární biologie jsou významné *umělé kvasinkové chromozomy* (YAC – Yeast artificial chromosomes), které slouží jako klonovací vektory pro fragmenty DNA o velikosti 200-800 kb [12].

Mnoho askomycetních kvasinek má však také negativní význam. Jedná se o původce kažení různých druhů potravin a také o patogeny lidí, zvířat a rostlin. Na kažení potravin se podílejí například *Candida parapsilosis* způsobující znehodnocení margarínů a mléčných výrobků, nebo zástupci rodu *Pichia*, tvořící tzv. *křís* na hladině piva a vína ve špatně uzavřených lahvách [13, 14].

Jedním z nejznámějších lidských patogenů je askomycetní kvasinka *Candida albicans*, která je tzv. *oportunistickým patogenem*, tzn., že způsobuje onemocnění pouze za určitých okolností například v případě lidí se sníženou imunitou nebo pacientů prodávajících chemoterapii. Nejčastěji „kolonizuje“ ústní sliznici, gastrointestinální a urogenitální trakt ve formě biofilmu a způsobuje infekce krevního řečiště (kandidémie) [15].

## 2.2 Vybrané druhy askomycetních kvasinek

### 2.2.1 *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij (1952)

**Anamorfní forma:** *Candida famata* (Harrison) S. A. Meyer & Yarrow var. *famata* [5]

**Variety:** *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* [16]

**Synonyma:** *Saccharomyces hansenii* Zopf (1889), *Pichia hansenii* (Zopf) Campbell (1973) [5]

#### Obecná charakteristika:

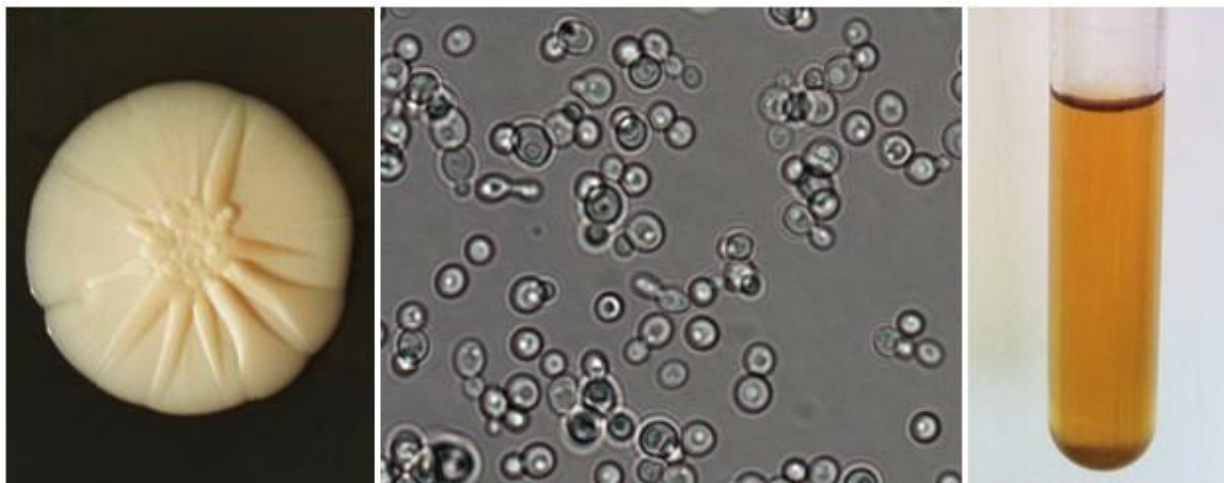
Díky schopnosti růstu při vyšší koncentraci soli, nízkém pH, nízké aktivitě vody, produkci kyseliny mléčné a citronové, je *D. hansenii* běžnou součástí mikroflóry sýrů. Zároveň byl tomuto druhu přidělen status QPS (Qualified Presumption of Safety), který povoluje použití této kvasinky při výrobě a zrání sýrů a fermentovaných salámů [17, 18].

Některé kmeny *D. hansenii* byly izolovány z povrchu rostlin a potravin s vysokým obsahem cukrů například ovocných džusů, vína nebo piva. Mimo jiné je *D. hansenii* nejvíce zastoupenou askomycetní kvasinkou v mořských vodách [17, 18].

Své uplatnění nachází *D. hansenii* také jako biokontrolní agens proti patogenním plísním *Penicillium digitatum* nebo *Botrytis cinerea*, které napadají ovoce a zeleninu [13].

Charakteristické jsou pro tento druh kulovité tvary buněk (**Obr. 2**). Na sladinném agaru tvoří *D. hansenii* krémově zbarvené kolonie s celistvými okraji a nepravidelným radiálním rýhováním (**Obr. 2**). V tekutém sladinném agaru po 4 dnech a při 20 °C tvoří pouze nepatrný světlý zákal bez prstence s viditelnou tmavě zbarvenou usazeninou (**Obr. 2**).

Askospory mají kulovitý tvar a bradavičnatou stěnu. Jejich počet se pohybuje v rozmezí 1-4, přičemž zůstávají součástí vřevka a neuvolňují se [17].



**Obr. 2** *Debaryomyces hansenii* (CCY 41-6-21): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladinném médiu (vpravo).

### 2.2.2 *Hanseniaspora guilliermondii* Pijper (1928)

**Anamorfní forma:** *Kloeckera apis* Lavie ex M. Th. Smith, Simione & S. A. Meyer [5]

**Synonyma:** *Hanseniaspora melligeri* Lodder (1932)

*Hanseniaspora apuliensis* Castelli (1948) [5]

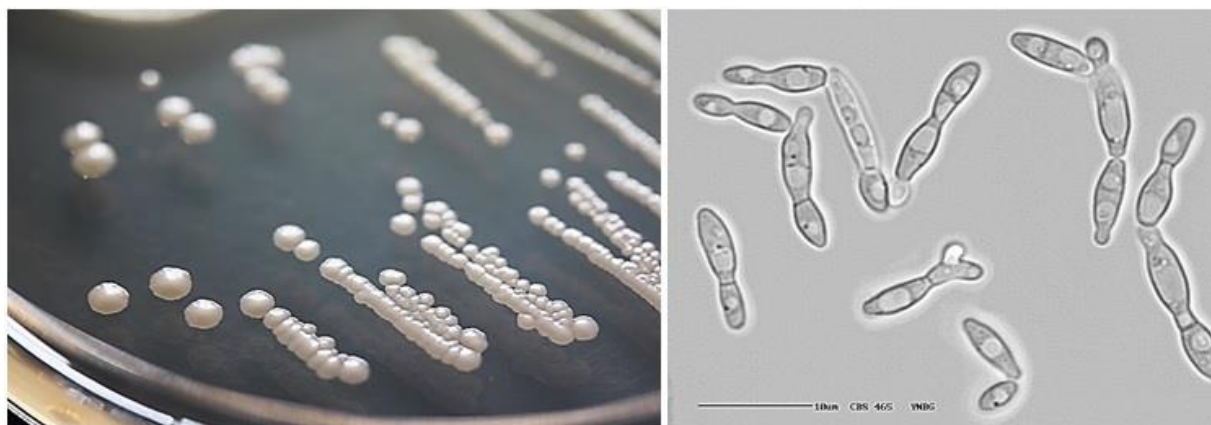
#### **Obecná charakteristika:**

Pro rod *Hanseniaspora* a jeho zástupce *H. guilliermondii* jsou charakteristické buňky citronového, protáhlého někdy i kulovitěho tvaru, vyskytující se samostatně nebo v párech (**Obr. 3**). Vegetativně se rozmnožují především bipolárním pučením. Množství askospor ve vřecku závisí na druhu, přičemž právě *H. guilliermondii* tvoří až čtyři askospory [19].

*H. guilliermondii* tvoří kolonie krémové až máslové barvy s hladkým, lesklým povrchem a mírně vyvýšeným středem (**Obr. 3**) [19].

Přirozeně se tento druh vyskytuje na ovoci, především na plodech vinné révy. Některé kmeny byly také izolovány například z půdy, mořské vody, měkkýšů nebo savců [19].

Kromě glukózy je druh *H. guilliermondii* schopen fermentovat i celobiózu [19].



**Obr. 3** *Hanseniaspora guilliermondii*: kolonie na tuhém agaru (vlevo)[20], mikroskopické pozorování buněk (vpravo) [21].

### 2.2.3 *Hanseniaspora uvarum* (Niehaus) Shehata, Mrak & Phaff ex Smith (1984)

**Anamorfní forma:** *Kloeckera apiculata* (Reess emend. Klöcker) Janke [5]

**Synonyma:** *Saccharomyces apiculatus* Reess (1870)

*Pseudosaccharomyces apiculatus*(Reess) Klöcker (1912b) [5]

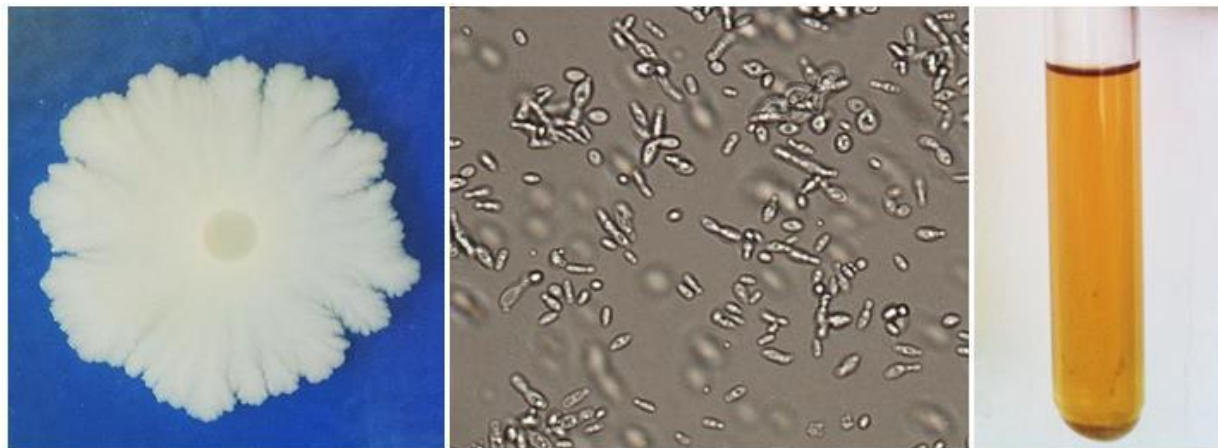
#### **Obecná charakteristika:**

Na sladinovém agaru tvoří druh *Hanseniaspora uvarum* matné kolonie bílé barvy s lehce vyvýšeným středem. Okraje kolonie jsou nepravidelně zvlněné a intenzivně členité až laločnaté (**Obr. 4**). Buňky dosahují citronového (apikulátního) až protáhlého tvaru, přičemž se vyskytují převážně samostatně, ale i ve dvojicích nebo skupinách (**Obr. 4**) Zákal v tekutém sladinovém médiu je velmi slabý, bez prstence a s patrnou usazeninou (**Obr. 4**).

Vřecko obsahuje obvykle 1-2 askospory saturnovitěho nebo kloboukovitěho tvaru, v některých případech s bradavičnatým povrchem [22].

Tento druh se hojně vyskytuje na zralém ovoci, především na bobulích vinné révy, což dokazuje spojitost *H. uvarum* s prvním stádiem fermentace v rámci výroby vína. Mnoho kmenů bylo mimo jiné izolováno také z kávy, kakaa, mořských živočichů – krevet, měkkýšů, ale taktéž při výrobě jogurtů [23, 24].

*H. uvarum*, stejně jako mnoho dalších askomycetních kvasinek, vykazuje antagonistické vlastnosti vůči plísním, odpovědných za kažení potravin. Příkladem takové plísně je *Botrytis cinerea*, která je původcem hniloby jahod a hroznového vína [23].



**Obr. 4** *Hanseniaspora uvarum* (CCY 46-1-2): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladidovém médiu (vpravo).

#### 2.2.4 *Kluyveromyces marxianus* (E. C. Hansen) van der Walt (1971)

**Anamorfní forma:** *Candida kefyr* (Beijerinck) van Uden & H. R. Buckley [5]

**Synonyma:** *Saccharomyces marxianus* E. C. Hansen (1888b)

*Zygosaccharomyces marxianus* (E. C. Hansen) Guilliermond & Negroni (1929) [5]

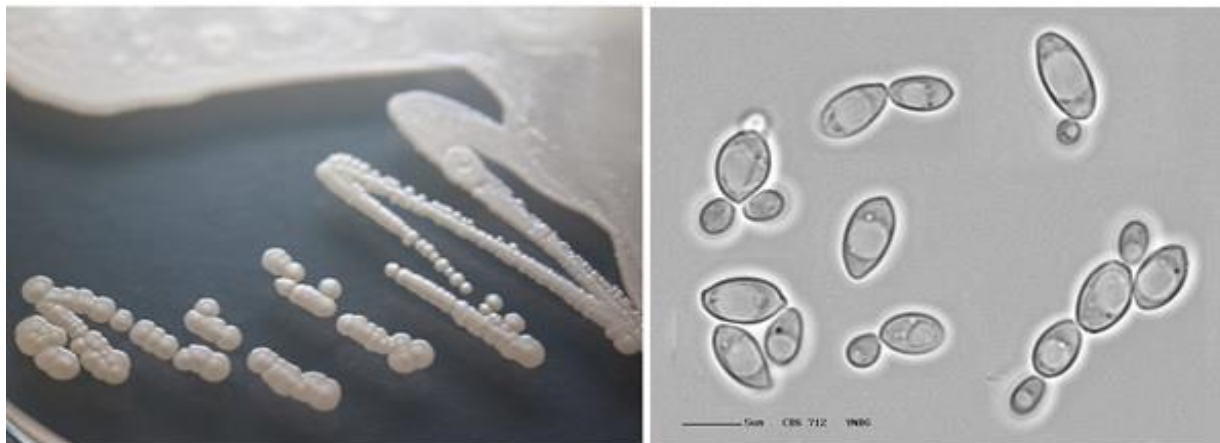
#### **Obecná charakteristika:**

*Kluyveromyces marxianus* (původně *K. fragilis*) je hemiaskomycetní, fakultativně anaerobní, homotalický druh, který je fylogeneticky příbuzný se *Saccharomyces cerevisiae* a je sesterským druhem *Kluyveromyces lactis*. Společnou vlastností *K. marxianus* a *K. lactis* je schopnost asimilovat laktózu jako zdroj uhlíku, a proto jsou tyto druhy nejčastěji izolovány z mléčných výrobků například z mléka, jogurtů nebo sýrů. Dlouhodobé a bezpečné použití v potravinářském průmyslu umožnilo oběma druhům dosáhnout statutu GRAS (Generally recognized as safe) a QPS [25].

*Kluyveromyces marxianus* je oproti *K. lactis* více využíván v průmyslu díky své vysoké růstové rychlosti s generační dobou cca 70 min, termotolerancí a schopnosti růstu až do 52 °C. Kromě mlékárenského průmyslu je *K. marxianus* používán také jako zdroj enzymů – laktázy, biosorbent pro těžké kovy, pro výrobu SCP (Single cell protein) nebo vitamínových doplňků pro lidi i zvířata [17, 25].

Kolonie *K. marxianus* jsou krémově zbarvené, s hladkým, lesklým povrchem a máslovitou texturou (**Obr. 5**). Barva kolonií může být i narůžovělá díky produkci pulcherriminu [5, 26].

Buňky dosahují kulovitého, elipsoidního nebo též cylindrického tvaru. Vyskytují se samostatně, v párech, ale také v krátkých řetězcích (**Obr. 5**). Askus obsahuje 1-4 askospory, které mohou být kulovité, elipsoidní i ledvinovité. V tekutém médiu je patrný sediment a prstenec [5, 27].



**Obr. 5** *Kluyveromyces marxianus*: kolonie na tuhém agaru (vlevo) [28], mikroskopické pozorování buněk (vpravo) [26].

### 2.2.5 *Kluyveromyces lactis* (Dombrowski) van der Walt (1971)

#### Variety:

- a) *Kluyveromyces lactis* (Dombrowski) van der Walt var. *lactis* (1986) [5]

**Synonyma:** *Saccharomyces lactis* Dombrowski (1910)

*Zygosaccharomyces lactis* Dombrowski (1910) [5]

**Anamorfní forma:** *Candida spherica* (Hammer & Cordes) S. A. Meyer & Yarrow [5]

- b) *Kluyveromyces lactis* (Dombrowski) van der Walt var. *drosophilarum* (Shehata, Mrak & Phaff) Sidenberg & Lachance (1986) [5]

**Synonyma:** *Zygosaccharomyces mrakii* Shehata & Mrak (1952) nom. inval.

*Sacchromyces drosophilarum* Shehata, Mrak & Phaff (1955) [5]

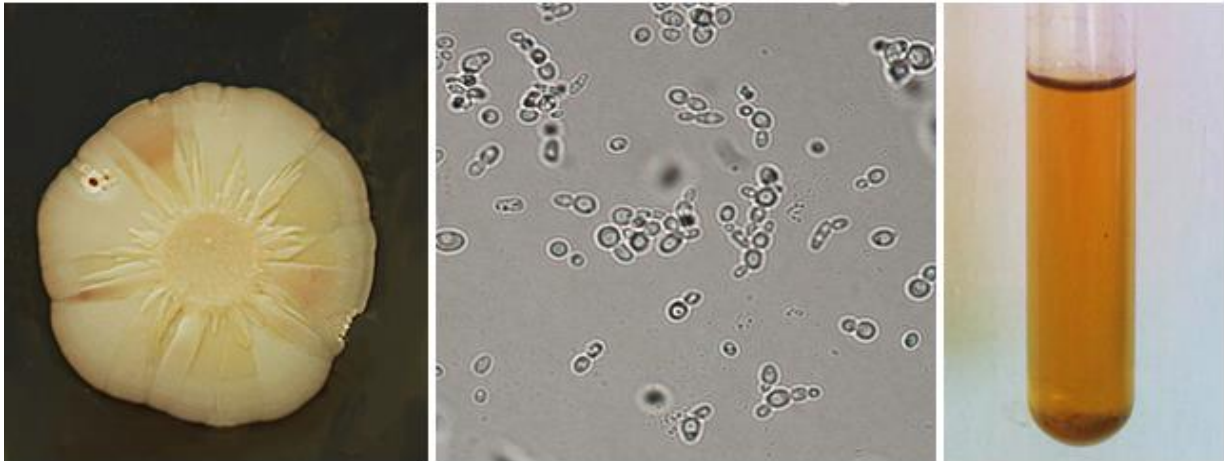
#### Obecná charakteristika:

Charakteristickým znakem *K. lactis* jsou elipsoidní a kulovité buňky, vyskytující se samostatně, ve dvojicích, ale také v řetězcích (**Obr. 6**). Kolonie na sladidinovém agaru vykazují krémovou, lehce narůžovělou nebo oranžovou barvu a zvlňný okraj s nepravidelnými radiálními rýhami směrem od středu kolonie. Růžová barva kolonií je způsobena produkcí pigmentu – pulcherriminu (**Obr. 6**) [5].

Zákal v tekutém sladidinovém médiu je po čtyřech dnech kultivace pouze mírný, bez prstence a se zjevnou usazeninou na dně zkumavky (**Obr. 6**).

Kvasinka *Kluyveromyces lactis* je schopna využít xylózu, xylitol, celobiózu, laktózu a arabinózu jak v tekutém tak i tuhém médiu. Jedná se o heterotalický druh s převážně haploidním životním cyklem. Varieta *K. lactis* var. *lactis* je domestikovaným druhem anarozdíl

od variety *K. lactis* var. *drosophilorum*, je výhradně používán v průmyslu díky schopnosti fermentovat laktózu. Mezi hlavní oblasti využití *K. lactis* var. *lactis* patří mlékarenský průmysl, dále také průmysl enzymů k produkci rekombinantního chymozinu a  $\beta$ -galaktozidázy pro výrobu bezlaktózových mléčných výrobků. Mimo jiné se tato varieta komerčně uplatňuje při tvorbě SCP a metabolitů jako jsou například laktát, D-glukonová kyselina a D-arabitol. Ve farmaceutickém průmyslu nachází *K. lactis* uplatnění v rámci produkce heterologních proteinů. Příkladem takového proteinu je interleukin 1- $\beta$ , který se používá při léčbě autoimunitních onemocnění, nebo interferon- $\alpha$  pro léčení rakoviny a chronické hepatitidy B a C [29].



**Obr. 6** *Kluyveromyces lactis* (CCY 50-2-2): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladidovém médiu (vpravo).

### 2.2.6 *Metschnikowia pulcherrima* Pitt & M. W. Miller (1968)

**Anamorfní forma:** *Candida pulcherrima* (Lindner) Windish [5]

**Synonyma:** *Torula pulcherrima* Lindner (1901)

*Torulopsis pulcherrima* (Lindner) Saccardo (1906) [5]

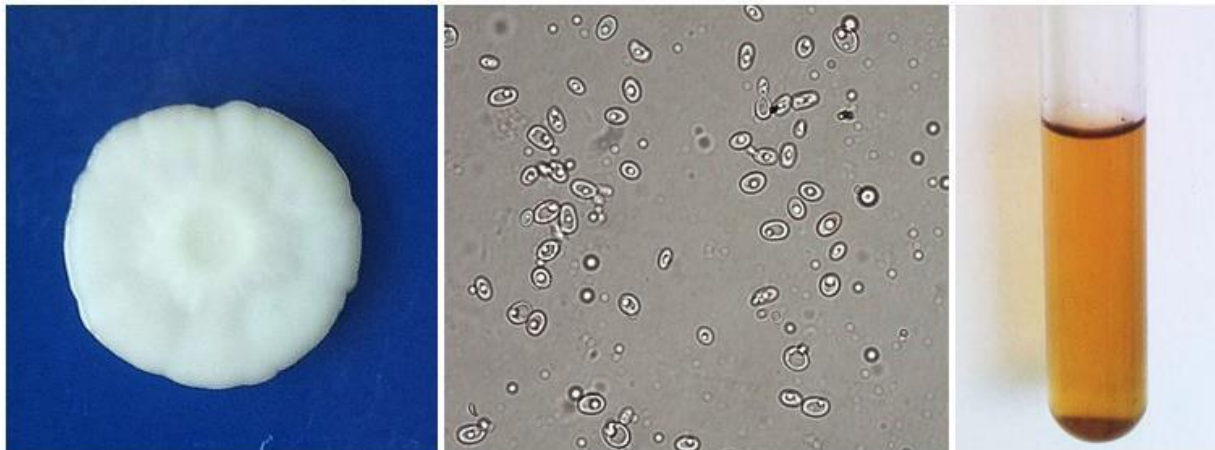
#### **Obecná charakteristika:**

Kolonie *M. pulcherrima* jsou bíle zbarvené, s hladkým, matným povrchem, vyvýšeným a kráterovitým středem. Okraje kolonie jsou nepravidelně zvlňené a s drobnými rýhami (**Obr. 7**). Buňky jsou kulovitěho nebo elipsoidního tvaru a vyskytují se převážně samostatně (**Obr. 7**). V tekutém sladidovém médiu je pouze slabý zákal a usazenina na dně zkumavky (**Obr. 7**).

V rámci pohlavního rozmnožování jsou charakteristické 1-2 jehlovité askospory, přičemž vřecko se tvoří z chlamydospor a dosahuje sféroidního tvaru [30].

*Metschnikowia pulcherrima* se hojně vyskytuje na rostlinách a ovoci, zejména na povrchu plodů vinné révy. Tento druh je považován za běžnou součást mikroflóry přezrálých hroznů a hroznů používaných k výrobě ledových a botritických vín. Zároveň působí jako biokontrolní agens hniloby jablek, kterou způsobují patogenní plísně *Botrytis cinerea* nebo zástupci rodů *Penicillium* a *Monilia* [31].

V závislosti na kultivačních podmínkách může *M. pulcherrima* produkovat červeno-hnědý pigment *pulcherrimin*, který představuje chelátový komplex s ionty železa. Je produkován do média, přičemž tvoří jasně viditelnou zónu okolo kolonií [30, 32]. Současně bylo prokázáno, že pulcherrimin disponuje určitou antimikrobiální aktivitou právě vůči plísni *B. cinerea* [33].



**Obr. 7** *Metschnikowia pulcherrima* (CCY 29-2-121): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladivém médiu (vpravo).

### 2.2.7 *Metschnikowia reukaufii* Pitt & M. W. Miller (1968)

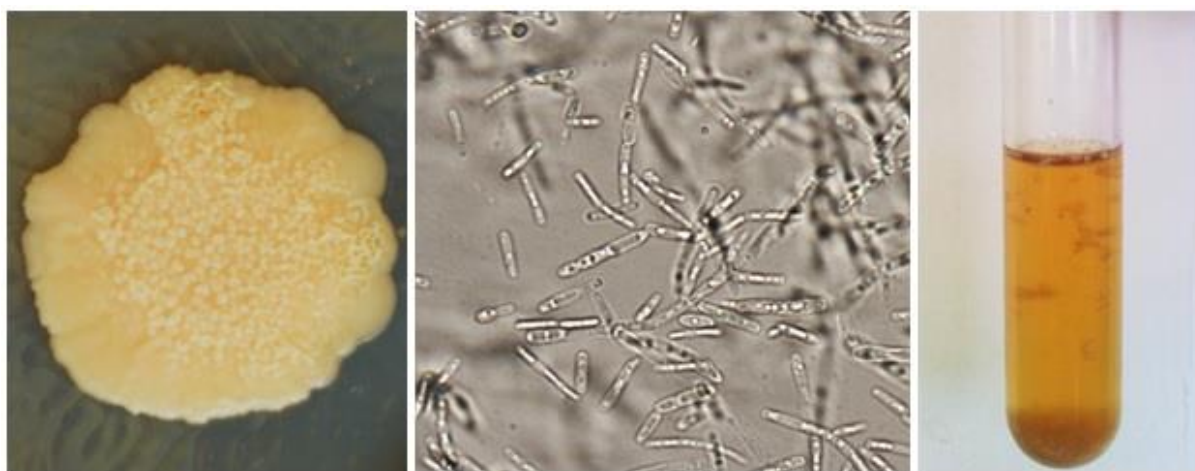
**Anamorfní forma:** *Candida reukaufii* (Grüss) Diddens & Lodder [5]

**Synonyma:** *Candida reukaufii* (Grüss) Diddens & Lodder (1942)

*Chlamydozyma reukaufii* Wickerham (1964a) [5]

#### Obecná charakteristika:

Kolonie *Metschnikowia reukaufii* na sladivém agaru jsou krémově až lehce oranžově zbarvené, s částečně hladkým, bradavičnatým a lesknoucím se povrchem. Okraje kolonie jsou nepravidelně zvlňené s drobnými rýhami (**Obr. 8**). Buňky jsou převážně cylindrické a mohou se vyskytovat samostatně nebo v řetízcích (**Obr. 8**). V tekutém sladivém médiu tvoří hustou usazeninu, slabý prstenec krémové barvy a zákal se shluky buněk (**Obr. 8**).



**Obr. 8** *Metschnikowia reukaufii* (CCY 29-1-21): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladivém médiu (vpravo).

Vřecko obvykle dosahuje stopkovitého nebo kyjovitého tvaru a obsahuje dvě vzácně i jednu askosporu [5].

Výskyt *Metschnikowia reukaufii* je spojen s nektarem květů rostlin a hmyzem, který se tímto nektarem živí. Kromě nektaru byla přítomnost *M. reukaufii* potvrzena i v medu v hnízdech čmeláků. Z biotechnologického a klinického hlediska je využití *M. reukaufii* neznámé [5, 34].

### 2.2.8 *Meyerozyma guilliermondii* (Wickerham) Kurtzman & M. Suzuki (2010)

**Anamorfní forma:** *Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron & Guerra [5]

**Synonyma:** *Endomyces guilliermondii* Castellani (1912a)

*Pichia guilliermondii* Wickerham (1966) [5]

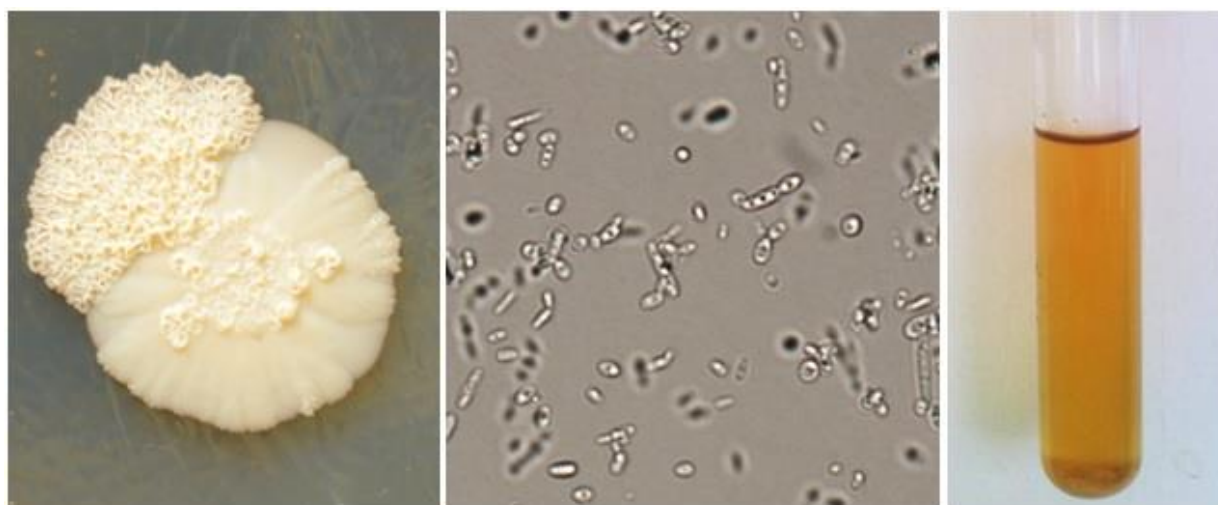
#### **Obecná charakteristika:**

Na sladínovém agaru po 4 dnech kultivace a při 20 °C tvoří *Meyerozyma guilliermondii* kolonie krémové barvy s kučeravým a vyvýšeným středem, částečně pilovitými okraji a nepravidelnými rýhami směřujícími od středu k okrajům (**Obr. 9**). Buňky dosahují elipsoidního nebo cylindrického tvaru a mohou být uspořádané ve dvojicích nebo samostatně (**Obr. 9**). Zákal v tekutém sladínovém médiu je nepatrný, bez prstence a s usazeninou na dně zkumavky (**Obr. 9**).

Kvasinka *Meyerozyma guilliermondii* je hojně rozšířená v životním prostředí a také jako součást lidské saprofytické mikroflóry. Blíže příbuzným druhem je *Meyerozyma carribica*, který je prakticky fenotypově nerozlišitelný od druhu *M. guilliermondii* [35, 36].

Anamorfní forma *Candida guilliermondii* reprezentuje modelový organismus pro studium naprodukce vitamínu riboflavinu (B<sub>2</sub>). Zároveň se tento druh řadí mezi vzácné kvasinky, rostoucí na *n*-alkanech, jakožto zdroji uhlíku a energie. Díky této vlastnosti je *C. guilliermondii* schopna produkce single cell proteinu z uhlovodíků [37].

*C. guilliermondii* je jedním z nejvíce efektivních druhů kvasinek pro biokonverzi xylózy na xylitol, který se využívá jako sladidlo. Mimo jiné je tento druh slibným zdrojem enzymů například inulináz [37].



**Obr. 9** *Meyerozyma guilliermondii* (CCY 39-23-12): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladínovém médiu (vpravo).

### 2.2.9 *Pichia fermentans* Lodder (1932)

**Anamorfní forma:** *Candida lambica* (Lindner & Genoud) van Uden & H. R. Buckley [5]

**Synonyma:** *Zymopichia fermentans* (Lodder) Novák & Zsolt (1961)

*Saccharomyces pastorianus-arborescens* van Laer (1902) [5]

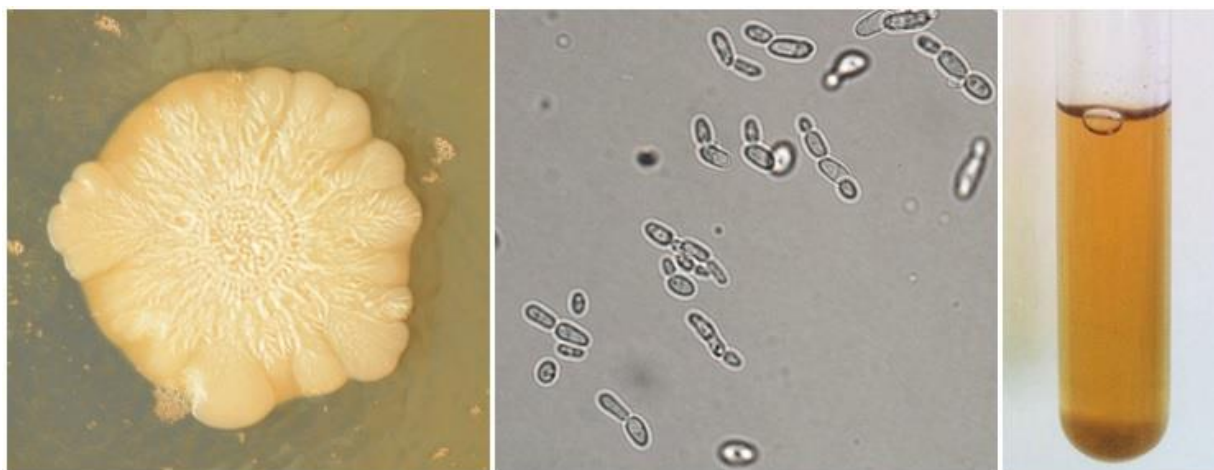
#### **Obecná charakteristika:**

Kolonie *Pichia fermentans* vykazují krémovou až světlě oranžovou barvu a výrazně členitý, z části lesklý povrch připomínající strukturu kořenů vedoucí od středu kolonie k okrajům. Samotné okraje jsou částečně celistvé a nepravidelně cípovité (**Obr. 10**). Buňky dosahují cylindrického nebo elipsoidního tvaru, přičemž se vyskytují v párech nebo v řetězcích (**Obr. 10**). V tekutém sladidinovém médiu je patrný slabý zákal se sedimentem, ale bez prstence (**Obr. 10**).

Askus obsahuje obvykle 2-4 askospory kloubkovitého tvaru. Z hlediska vegetativního rozmnožování je pro druh *P. fermentans* typické multilaterální pučení [5, 38].

*Pichia fermentans* je kvasinka tvořící biofilm na povrchu ovoce. Charakteristickým znakem tohoto druhu je dimorfismus, tedy schopnost „přepínat“ mezi kvasinkovou formou a pseudohýfálním stádiem. A právě samotný biofilm může být tvořen buď kvasinkovitými buňkami, anebo pseudomyceliem, což závisí na nutričních a přírodních podmínkách. Současně působí *P. fermentans* jako biokontrola hnědé hniloby jablek, způsobené plísní rodu *Monilia*. Avšak na povrchu broskví vykazuje tento druh nezvyklé patogenní chování, kdy způsobuje rozklad rostlinné tkáně v nepřítomnosti plísně *Monilia fructicola* [39, 40].

Velký potenciál skýtá využití *P. fermentans* k extracelulární biologické syntéze nanočástic stříbra a oxidu zinečnatého, které mají prokázané antimikrobiální účinky vůči Gram negativním klinickým patogenům například zástupcům rodu *Pseudomonas* [41].



**Obr. 10** *Pichia fermentans* (CCY 39-4-6): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladidinovém médiu (vpravo).

### 2.2.10 *Pichia kluyveri* Bedford ex Kudryavtsev (1960)

**Synonyma:** *Zygosaccharomyces bisporus* Anderson (1917)

*Hansenula kluyveri* Bedford ex Kudryavtsev (1960)

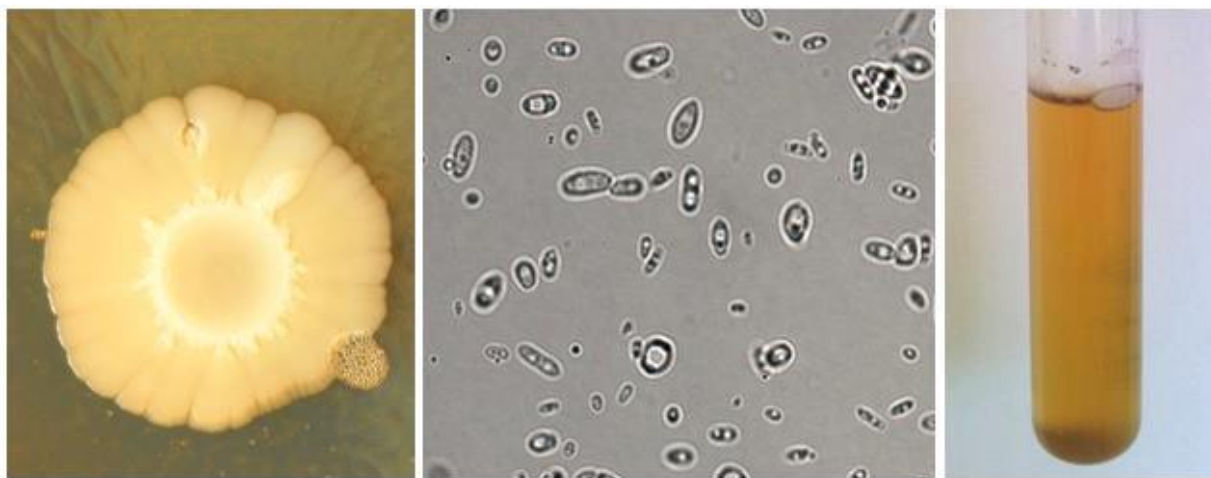
#### Obecná charakteristika:

Kolonie druhu *Pichia kluyveri* se vyznačují světlě oranžovou barvou, mírně a nesymetricky zvlňnými okraji, nepravidelným radiálním rýhováním a bíle zbarveným „kruhem“ ve středu kolonie (**Obr. 11**). Buňky, převážně elipsoidního i cylindrického tvaru, se pak vyskytují většinou samostatně, méně často také ve dvojicích (**Obr. 11**). V tekutém sladinném médiu je patrný intenzivnější zákal s usazeninou a náznakem tvořícího se prstence na hladině média (**Obr. 11**).

Počet askospor, které dosahují kloboukovitého tvaru, je obvykle 2-4 a jsou uvolněny brzy po vzniku samotného vřecha [5].

Spolu se zástupci rodu *Saccharomyces* a *Hanseniaspora* hraje tento druh důležitou roli v rámci fermentace kakaových bobů pro výrobu čokolády. Počáteční fáze fermentace je dominantou kvasinek, postupně se však tohoto procesu zúčastňují také bakterie mléčného, octového kvašení a aerobní sporulující bakterie [42].

Z biotechnologického a klinického hlediska je význam *P. kluyveri* neznámý. Některé kmeny *Pichia kluyveri*, hrající roli v procesu zpracování kávy, jsou však schopné produkovat enzymy degradující pektin [5, 43].



**Obr. 11** *Pichia kluyveri* (CCY 39-31-4): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladinném médiu (vpravo).

### 2.2.11 *Pichia kudriavzevii* Boidin, Pignal & Besson (1965b)

**Anamorfní forma:** *Candida krusei* (Castellani) Berkhout

**Synonyma:** *Saccharomyces krusei* Castellani (1910), *Endomyces krusei* Castellani (1912b) [5]

#### Obecná charakteristika:

*Pichia kudriavzevii* tvoří na sladinném agaru kolonie krémové až slabě oranžové barvy, s lehce vyvýšeným a kráterovitým středem. Okraje jsou nepravidelně zvlňné, s hlubokými radiálními rýhami a nesymetricky členité až laločnaté (**Obr. 12**).

Buňky dosahují elipsoidního až cylindrického tvaru a ve značné míře se vyskytují samostatně (**Obr. 12**). V tekutém médiu je u hladiny média jasně patrný bíle zbarvený, šplhající prstenec, nicméně samotný zákal v médiu je velmi slabý (**Obr. 12**).



**Obr. 12** *Pichia kudriavzevii* (CCY 29-9-28): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladidlovém médiu (vpravo).

Askospory jsou kulovitěho tvaru a s hladkým povrchem. Vřecko obvykle obsahuje jednu askosporu, avšak u několika kmenů bylo zjištěno, že počet askospor může být i 1-2 [5].

Kmeny *P. kudriavzevii* byly izolovány například z potravin, konkrétně z ovoce – ananasový, pomerančový džus, dále také z kakaových bobů, z kvásku nebo fermentovaných výrobků pocházejících z Afriky [44].

Z hlediska komerčního využití je významná schopnost *P. kudriavzevii* fermentovat xylózu za vzniku ethanolu. Kromě ethanolu se využívá i produkce enzymů – fytáz, které jsou zásadní při výrobě a zpracování potravin a krmiva [44].

Vzhledem k vzrůstajícímu znečištění životního prostředí kovy například zinkem, je možné *P. kudriavzevii* potenciálně využít v procesu bioakumulace tohoto kovu při zpracování odpadu z rybolovu [45].

### 2.2.12 *Pichia jadinii* (Sartory, R. Sartory, Weill & J. Mey.) Kurtzman (1979)

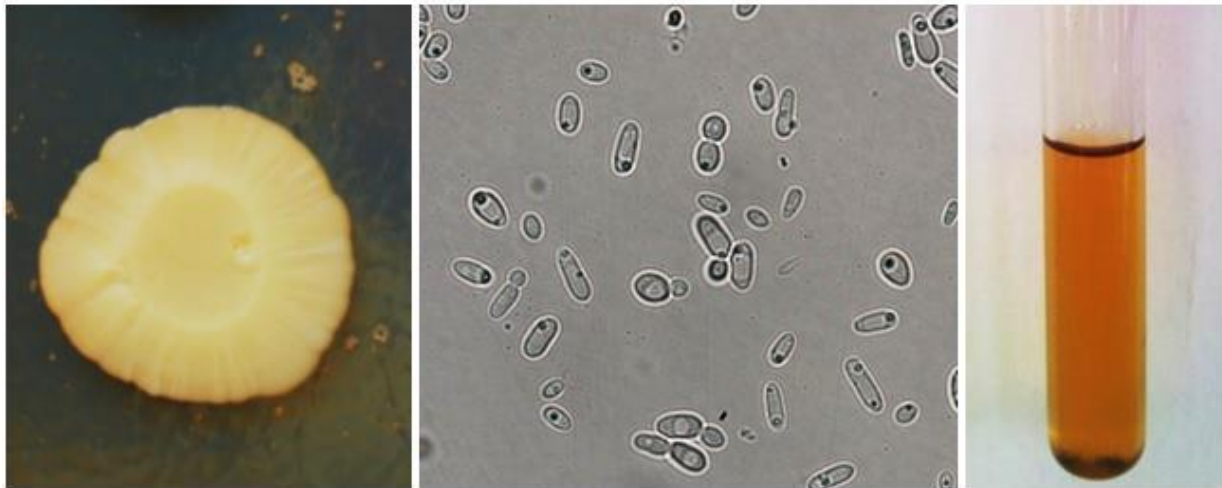
**Anamorfní forma:** *Candida utilis* (Henneberg) Lodder & Kreger (1952) [5]

**Synonyma:** *Cyberlindnera jadinii* (Sartory, R. Sartory, Weill & J. Mey.) Minter (2009)

*Hansenula jadinii* (Sartory, R. Sartory, Weill & J. Mey.) Wick (1951) [47]

#### **Obecná charakteristika:**

Na sladidlovém agaru tvoří *Pichia jadinii* krémové až nažloutlé kolonie, s hladkým povrchem a mírně vyvýšeným středem. Okraje kolonie jsou hladké, nepravidelně zvlněné a členité s vyšším počtem radiální rýh směřujících od středu kolonie k okrajům (**Obr. 13**). Buňky se vyskytují většinou samostatně a jejich tvar je elipsoidní nebo cylindrický (**Obr. 13**). V tekutém sladidlovém médiu je po čtyřech dnech pouze minimální zákal s patrnou usazeninou a bez prstence (**Obr. 13**).



**Obr. 13** *Pichia jadinii* (CCY 29-38-75): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladidlovém médiu (vpravo).

Počet askospor se pohybuje v rozmezí 1-4 a jejich tvar je kloboukovitý. Vegetativně se tento druh rozmnožuje multilaterálním pučením [47].

V papírenském průmyslu se využívá schopnosti *Pichia jadinii* utilizovat pentózy a podílet se tak na zpracování odpadních vod [48].

V klinické oblasti byly popsány antagonistické vlastnosti *P. jadinii* vůči důležitému lidskému patogenu – *Candida albicans* [49].

Anamorfní forma – *Candida utilis* byla průmyslově kultivována již v období první světové války, kdy byl nedostatek zdrojů proteinů a jako alternativa pro obživu sloužil tzv. *single cell protein* (SCP), který splňoval požadavky z hlediska obsahu bílkovin, nukleotidů, vitamínů, ale i chuti a vůně. *Candida utilis* slouží také jako zdroj například enzymů – invertáz, biotinu, glutathionu a ribonukleových kyselin. Mimo jiné je tento druh schopen biotransformace benzaldehydu na L-fenylacetylkarbinol, což je důležitý prekurzor pro výrobu efedrinu a pseudoefedrinu. Stejně jako *S. cerevisiae* tak i kvasinka *C. utilis* byla klasifikována jako GRAS mikroorganismus, díky svému dlouholetému a bezpečnému využití v potravinářském průmyslu [49].

### 2.2.13 *Saccharomyces bayanus* Saccardo (1895)

**Variety:** *Saccharomyces bayanus* Saccardo var. *bayanus* (2000)

*Saccharomyces bayanus* Saccardo var. *uvarum* Naumov (2000) [5]

**Synonyma (var. *bayanus*):** *Saccharomyces heterogenicus* Osterwalder (1924)

*Saccharomyces intermedius* E. C. Hansen var. *valdensis*

**(var. *uvarum*):** *Saccharomyces globosus* Osterwalder (1924)

*Saccharomyces tubiformis* Osterwalder (1924) [5]

### Obecná charakteristika:

Zástupce rodu *Saccharomyces* – *Saccharomyces bayanus* tvoří na sladínovém agaru kolonie krémové barvy se světle oranžovým a vyvýšeným až kráterovitým středem. Povrch kolonií je hladký a matný. Okraje kolonie jsou mírně zvlněné a s téměř pravidelnými radiálními rýhami (**Obr. 14**).

Buňky se vyskytují výhradně samostatně a dosahují elipsoidního, protáhlého až cylindrického tvaru (**Obr. 14**) V tekutém sladínovém médiu je patrný mírný zákal, výrazná usazenina a náznak formování prstence (**Obr. 14**).



**Obr. 14** *Saccharomyces bayanus* (CCY 21-13-5): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladínovém médiu (vpravo).

Pučící buňky se přímo transformují do přetrvávajícího vřECKA, které obsahuje jednu až čtyři askospory kulovitěho nebo elipsoidního tvaru [5].

Z klinického hlediska je význam *S. bayanus* neznámý, neboť neroste při 37 °C a tudíž je nepravděpodobné, aby byl lidským patogenem [5].

Spolu s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*, která je dominantním druhem v rámci fermentačních procesů, se varieta *S. bayanus* var. *uvarum* podílí na kvašení vína a výrobě ciderů v chladnějších oblastech Evropy. Varieta *S. bayanus* var. *bayanus* je izolována z piva [50].

Oproti *S. cerevisiae*, je kvasinka *S. bayanus* více kryotolerantní a může tak být využita při fermentacích za nízké teploty. Navíc produkuje vyšší množství sukcinové kyseliny, glycerolu,  $\beta$ -fenylethanolu a naopak méně octové kyseliny. Použití *S. bayanus* při výrobě vína umožňuje také přidání nižšího množství siřičitanů pro jeho stabilizaci [51].

#### 2.2.14 *Saccharomyces pastorianus* E. C. Hansen (1904)

**Synonyma:** *Saccharomyces carlsbergensis* E. C. Hansen (1908)

*Saccharomyces monacensis* E. C. Hansen (1908) [5]

### Obecná charakteristika:

Na sladínovém agaru tvoří *Saccharomyces pastorianus* hladké a ploché kolonie s krémovou až světlou hnědou barvou. Okraje kolonie jsou mírně zvlněné a laločnaté. Tvar buněk je buď

kulovitý, elipsoidní nebo cylindrický (**Obr. 15**). Buňky se vyskytují buď samostatně, v párech nebo také ve skupinách (**Obr. 15**). V tekutém médiu může být přítomný sediment, ale i prstenec. Vřecko obsahuje 1-4 askospory kulovitého nebo téměř kulovitého tvaru [5].

Kvasinka *Saccharomyces carlsbergensis* (synonymum *S. pastorianus*) byla ustanovena jako první čistá kultura kvasinek spodního kvašení pro výrobu piva typu ležák. Byla poprvé izolována E. C. Hansenem pod názvem *Unterhefe No. 1* a je používána pro výrobu piva již od roku 1883 [52].

Při výrobě piva jsou kladeny vysoké nároky na kvalitu obilných zrn z hlediska obsahu mykotoxinů, které mohou být příčinou ztrát při výrobě nebo také ohrožovat lidské zdraví. Právě druh *S. pastorianus* disponuje během fermentace schopností eliminovat mykotoxiny – trichothecey (deoxynivalenol) produkované plísněmi rodu *Fusarium* [53].



**Obr. 15** *Saccharomyces pastorianus*: kolonie na tuhém agaru (vlevo) [54], mikroskopické pozorování buněk (vpravo) [55].

### 2.2.15 *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaya (1914)

**Synonyma:** *Zygosaccharomyces paradoxus* (Batschinskaya) Klöcker (1924)

*Zygosaccharomyces paradoxus* (Batschinskaya) Nishiwaki (1929) [5]

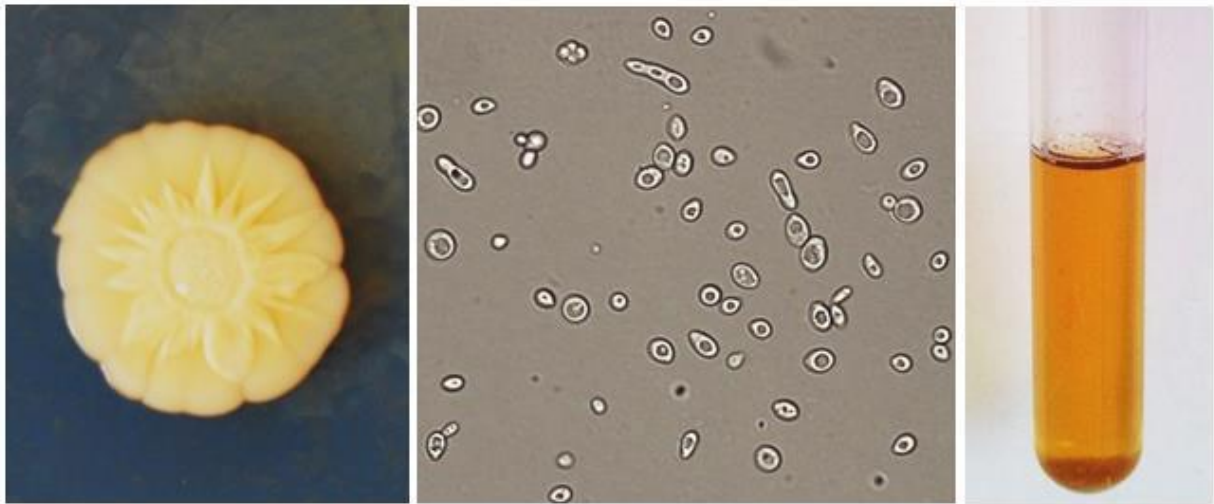
#### **Obecná charakteristika:**

Kolonie druhu *Saccharomyces paradoxus* na sladivém agaru jsou hladké, matné a částečně krémové a nažloutlé barvy. Okraje kolonie jsou hladké, mírně a nepravidelně zvlňené. Střed kolonie je vyvýšený, s radiálními rýhami a charakteristickým útvarem, který nápadně připomíná okvětní listy rostlin (**Obr. 16**). Buňky mohou být buď kulovitého, elipsoidního nebo cylindrického tvaru a většinou se vyskytují samostatně (**Obr. 16**). V tekutém sladivém médiu je patrný mírný zákal, usazenina a náznak formování prstence (**Obr. 16**).

Počet askospor ve vřecku se pohybuje v rozmezí 1-4 a jejich tvar je většinou kulovitý [5].

*S. paradoxus* se přirozeně vyskytuje v půdě, na rostlinách, hmyzu, ale také na vinicích v Chorvatsku [56].

*Saccharomyces paradoxus* je považován za nejbližší příbuzný druh *S. cerevisiae*. Prakticky jsou tyto dva druhy fenotypově nerozlišitelné a sdílejí stejné profily asimilace a fermentace organických sloučenin, což naznačuje, že se pravděpodobně vyvinuly v podobném prostředí. Na rozdíl od *S. cerevisiae*, není druh *S. paradoxus* domestikován a nepodílí se na fermentačních procesech určených pro lidskou spotřebu [57].



**Obr. 16** *Saccharomyces paradoxus* (CCY 21-4-109): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladidovém médiu (vpravo).

### 2.2.16 *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen (1883)

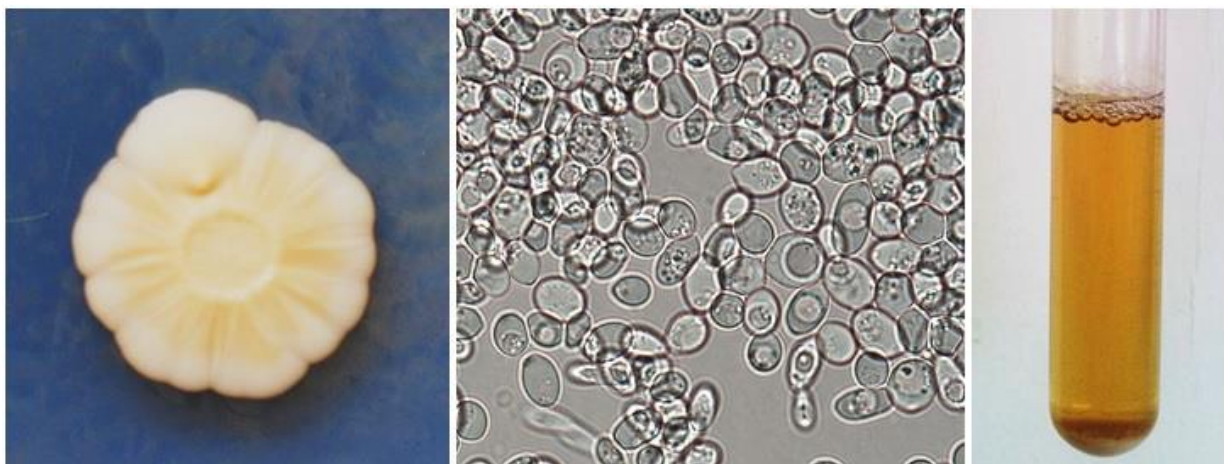
**Synonyma:** *Saccharomyces ellipsoideus* Meyen ex E. C. Hansen (1883)  
*Saccharomyces ilicis* Grönlund (1892) [5]

#### Obecná charakteristika:

Kolonie *Saccharomyces cerevisiae* na sladidovém agaru vykazují krémovou až slabě oranžovou barvu, kráterovitý profil, matný vzhled a radiální rýhy. Okraje kolonie jsou nepravidelně zvlňené až cípovité (**Obr. 17**).

Buňky dosahují kulovitého, vejcovitého nebo protáhlého tvaru, přičemž se vyskytují samostatně nebo ve skupinách (**Obr. 17**).

Zákal v tekutém sladidovém médiu je po čtyřech dnech kultivace velmi slabý, nicméně s patrnou usazeninou na dně zkumavky (**Obr. 17**).



**Obr. 17** *Saccharomyces cerevisiae* (CCY 48-35): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladidovém médiu (vpravo).

Z hlediska fermentace, je druh *S. cerevisiae* schopen využít glukózu, galaktózu, sacharózu, rafinózu, ale laktózu nikoliv [5].

O důležitosti a potenciálu *Saccharomyces cerevisiae* pro průmyslové, ale i vědecké účely svědčí fakt, že genom této kvasinky byl vůbec první kompletně sekvenovaný eukaryotický genom a to v roce 1996. Navíc díky svému dlouholetému využití v potravinářském průmyslu nese od Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) označení GRAS [58, 59].

Dominantní odvětví potravinářského průmyslu, kde se *S. cerevisiae* hojně využívá, jsou výroba piva, vína, lihu a droždí, dále také v rámci produkce mléčných výrobků, zejména měkkých sýrů a sýrů s modrou plísní [60].

*S. cerevisiae* dokáže akumulovat značné množství steroidní sloučeniny – ergosterolu, který je prekurzorem vitamínu D<sub>2</sub> a je přidáván do margarínů a krmiv. I když je *S. cerevisiae* nekarotenoidní kvasinkou, geneticky se modifikuje za účelem produkce karotenoidů [61].

Mimo jiné se *S. cerevisiae* uplatňuje při produkci heterologních proteinů nebo také jako „biokatalyzátor“ transformačních procesů pro odstranění polutantů ze životního prostředí [5].

Ačkoliv je kvasinka *S. cerevisiae* spojena se vznikem řady humánních infekcí, z klinického hlediska je však považována za oportunistický patogen [62].

#### **2.2.17 *Torulaspóra delbrueckii* (Lindner) Lindner 1904**

**Anamorfní formy:** *Candida colliculosa* (Hartmann) S. A. Meyer & Yarrow [5]

**Synonyma:** *Saccharomyces delbrueckii* Lindner (1895)

*Zygosaccharomyces delbrueckii* (Lindner) Krumbholz (1933) [5]

#### **Obecná charakteristika:**

Na sladidlovém agaru tvoří *Torulaspóra delbrueckii* kolonie máslovitého, částečně matného, ale i lesknoucího se charakteru se sníženým středem a hladkými okraji bez rýh. Barva kolonií může být bílá, oranžová až světle hnědá (**Obr. 18**) [5].

Buňky dosahují kulovitěho nebo elipsoidního tvaru, přičemž se vyskytují samostatně, příležitostně také v párech (**Obr. 18**). Počet askospor kulovitěho tvaru se pohybuje v rozmezí 1-4 a mohou vykazovat částečně zdrsňený povrch [5].

*T. delbrueckii* nachází své uplatnění ve vinařství a pivovarnictví. V pekařství se využívá díky své schopnosti nakypřit těsto a odolnosti vůči velmi nízkým teplotám a osmotickému tlaku. Dále je *T. delbrueckii* spojována s bioprocesy, jako je například fermentace okurek, oliv, ale také s výrobou alkoholických a fermentovaných nápojů například tequilla, cider, džus nebo kefir. Nicméně je *Torulaspóra delbrueckii* také původcem kažení ovocných koncentrátů, sýrů a vín [63, 64].

Ačkoliv není *T. delbrueckii* schopna provést kompletní alkoholové kvašení z důvodu vyčerpání veškerých sacharidů ze substrátu, produkuje ethanol v poměrně vysoké koncentraci. Na základě tohoto faktu byla *T. delbrueckii* dříve součástí rodu *Saccharomyces* [64].



**Obr. 18** *Torulaspora delbrueckii*: kolonie na tuhém agaru (vlevo) [65], mikroskopické pozorování buněk (vpravo)[66].

### 2.2.18 *Wickerhamomyces anomalus* (E. C. Hansen) Kurtzmann, Robnett & Basehoar – Powers (2008)

**Anamorfní formy:** *Candida pelliculosa* Redaelli [5]

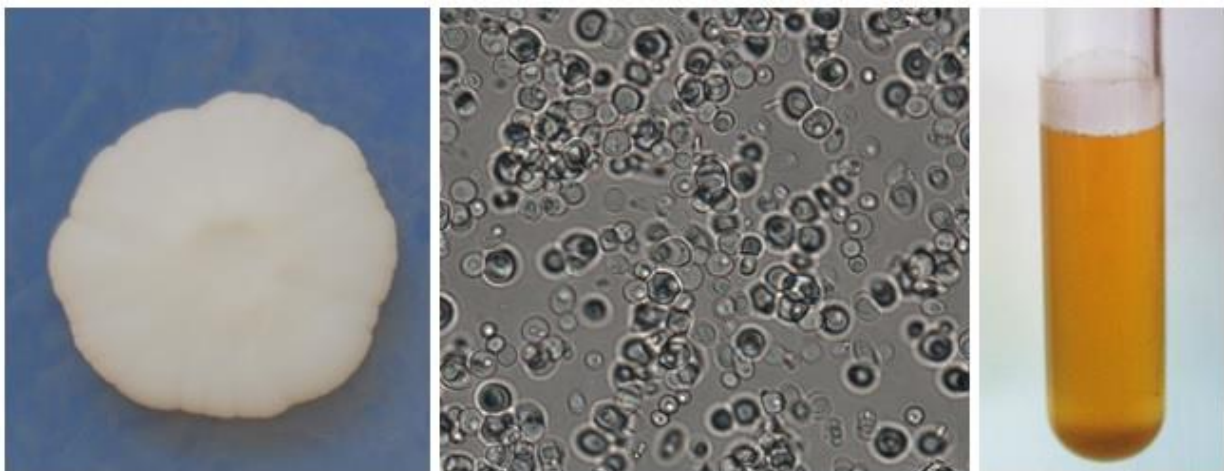
**Synonyma:** *Saccharomyces anomalus* E. C. Hansen (1891)

*Hansenula anomala* (E. C. Hansen) H. & P. Sydow (1919) [5]

#### **Obecná charakteristika:**

Na sladínovém agaru tvoří *Wickerhamomyces anomalus* kolonie krémové barvy, s hladkým a matným povrchem a lehce vyvýšeným středem. Okraje kolonie jsou hladké, nepravidelně zvlněné a zakončené radiálními rýhami směřujícími od středu kolonie (**Obr. 19**).

Tvar buněk je kulovitý a vyskytují se buď samostatně, v párech ale i ve skupinách (**Obr. 19**). V tekutém sladínovém médiu je patrný mírný zákal s usazeninou a intenzivním, bíle zbarveným a šplhajícím prstencem (**Obr. 19**).



**Obr. 19** *Wickerhamomyces anomalus* (CCY 38-1-35): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladínovém médiu (vpravo).

Jedná se o vysoce tolerantní mikroorganismus vůči stresovým faktorům z vnějšího prostředí. Kvasinka *W. anomalus* dokáže růst v širokém rozmezí teplot (3-37 °C), pH (2-12) a osmolarity. Právě díky těmto schopnostem je výskyt *W. anomalus* velmi rozmanitý. Některé kmeny byly izolovány například z kvetoucích rostlin, povrchů ovoce, mléčných a pekařských výrobků, odpadních vod a také lidských tkání [67].

Druh *Wickerhamomyces anomalus*, označovaný také jako *Hansenula anomala* nebo *Pichia anomala*, disponuje širokým biotechnologickým potenciálem především jako bioprezervační agens ke zvýšení bezpečnosti potravin (ovoce a cereálií) vůči houbám a plísním. Své uplatnění nachází *W. anomalus* také v produkci lidských rekombinantních proteinů nebo biopaliv [67, 68].

### 2.2.19 *Zygosaccharomyces bailii* (Lindner) Guilliermond (1912)

**Synonyma:** *Saccharomyces bailii* Lindner (1895)

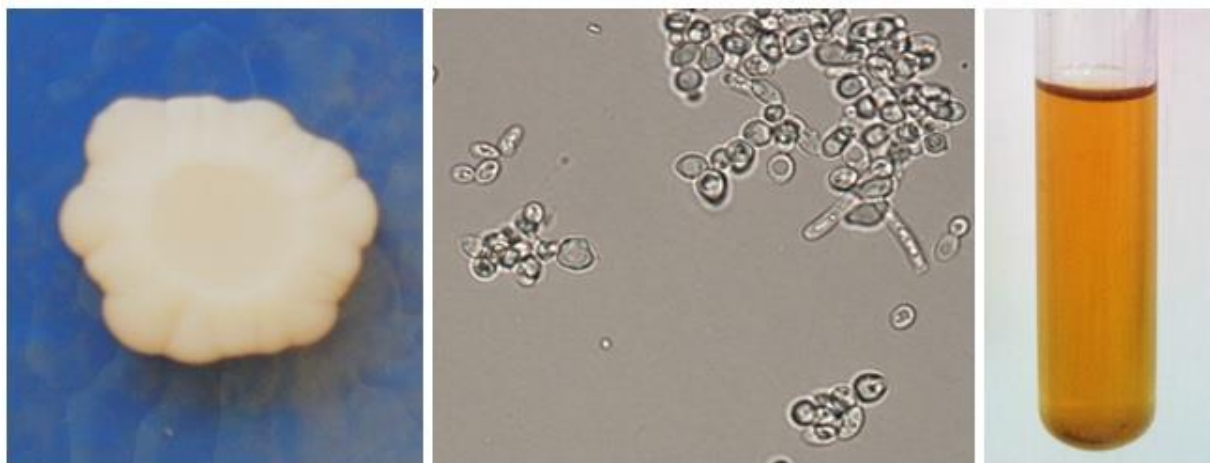
*Zygosaccharomyces mandshuricus* Saito (1914) [5]

#### **Obecná charakteristika:**

Kolonie druhu *Zygosaccharomyces bailii* jsou krémově zbarvené, s viditelně hladkým, matným povrchem a sníženým, kráterovitým středem. Směrem od středu k okrajům jsou patrné radiální rýhy. Samotné okraje jsou nepravidelně zvlněné až cípovité (**Obr. 20**).

Buňky dosahují kulovitého nebo elipsoidního tvaru a vyskytují se samostatně, v párech ale i ve skupinách (**Obr. 20**).

V tekutém sladinném médiu je zákal velmi slabý, přítomna je však usazenina na dně zkumavky a také náznak prstence (**Obr. 20**). Vřecko obsahuje 1-2 askospory kulovitého až vejcovitého tvaru s hladkým povrchem [5].



**Obr. 20** *Zygosaccharomyces bailii* (CCY 35-6-5): kolonie na tuhém agaru (vlevo), mikroskopické pozorování buněk (uprostřed), kultura v tekutém sladinném médiu (vpravo).

Kvasinka *Z. bailii* je známa jako původce kažení potravin, který je navíc vysoce tolerantní vůči konzervačním prostředkům, jako jsou kyselina sorbová, benzoová nebo octová, ale také vůči nízkému pH a nízké aktivitě vody. Jedná se o druh rostoucí přednostně na fruktóze, a proto se přirozeně vyskytuje na znehodnoceném vysušeném ovoci. Nejčastěji způsobuje kažení nealkoholických nápojů, vína, cideru, hořčice, majonézy a ovocných džusů [69, 70].

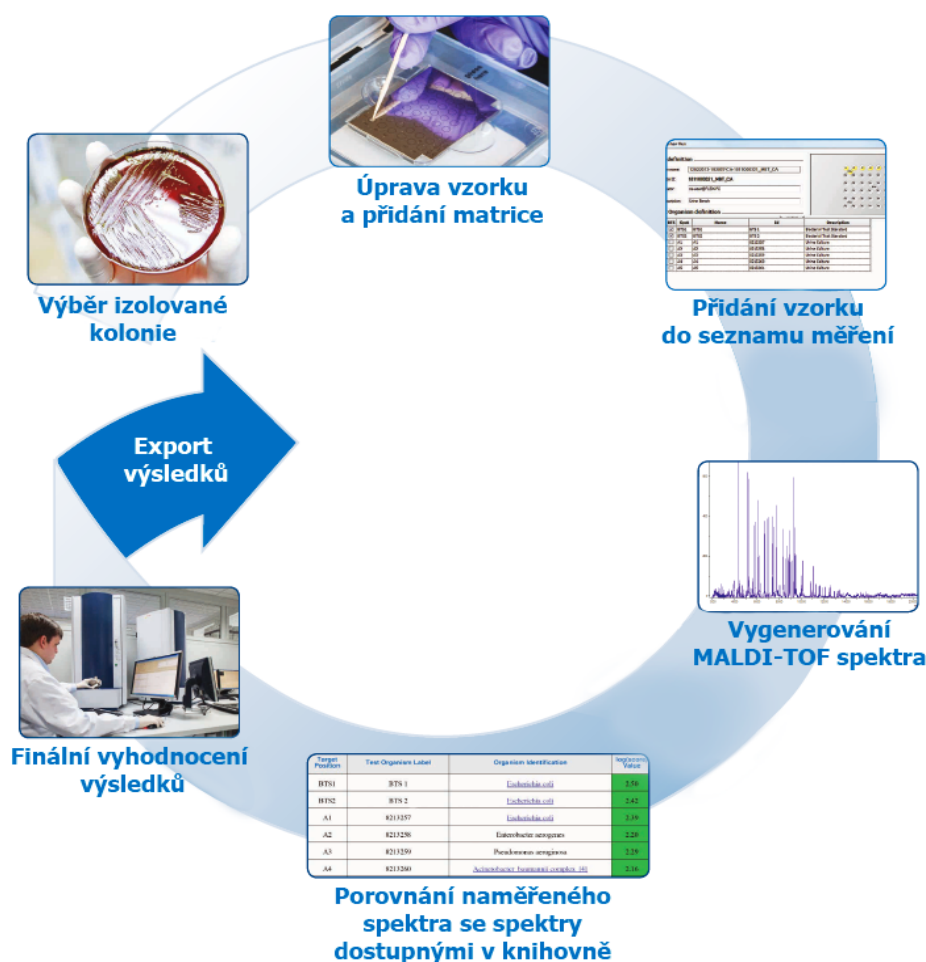
## 2.3 Metody identifikace kvasinek

### 2.3.1 Biotypizace hmotností spektrometrií MALDI-TOF

Biotypizace (biotyping) mikroorganismů hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF je metoda založená na porovnání hmotnostních spekter izolovaných kmenů bakterií, kvasinek nebo plísní se spektry tzv. typových kmenů [71, 72].

Konkrétně tato spektra představují unikátní profily intracelulárních proteinů, obvykle ribozomálních, které jsou vyextrahovány z vnitřního obsahu buňky organickým rozpouštědlem, které může být také součástí roztoku matrice. Vzhledem k tomu, že jsou tato spektra jedinečná, vysoce specifická a reprodukovatelná pro každý mikroorganismus, označují se termínem „otisk prstů“ (*fingerprint*) [71, 72].

Pro přesnou a správnou identifikaci mikroorganismů je nezbytné mít k dispozici nebo sestavit knihovnu hmotnostních spekter s dostatečným počtem spekter ve vysoké kvalitě, neboť absence odpovídajícího spektra v databázi je hlavní limitující faktor metody. Mimo jiné lze naměřená spektra vyhodnotit také manuálně vzájemným porovnáním vzorků. Schéma postupu biotypizace mikroorganismů je uvedeno na **Obr. 21** [71, 72].



**Obr. 21** Schéma postupu biotypizace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF [73].

Na trhu s hmotnostními spektrometry MALDI-TOF dominují dvě společnosti – Bruker Daltonik (SRN) a Shimadzu (Japonsko). Systém firmy Bruker Daltonik, jejíž hmotnostní spektrometr byl použit v této práci, se soustřeďuje na maxima 100 píků, které jsou brány v úvahu, pokud dosáhnou minimální kvality signálu (tj. v případě, že překročí stanovený poměr signál/šum) [74].

Naměřená hmotnostní spektra jsou vyhodnocena specifickým algoritmem, který vypočte tři separované hodnoty pro tři základní charakteristiky naměřeného a referenčního hmotnostního spektra definovaného mikroorganismu v databázi:

- Vyhodnocení počtu shodných signálů v referenčním a naměřeném spektru. Žádným shodným signálům odpovídá hodnota 0. Kompletní shodě naopak odpovídá hodnota 1.
- Vyhodnocení počtu blízkých signálů v referenčním a naměřeném spektru. Žádným blízkým signálům odpovídá hodnota 0, kompletní shodě odpovídá hodnota 1.
- Výpočet symetrie shodných signálních párů. Pokud korespondují vysoce intenzivní signály v naměřeném spektru s těmito signály v referenčním spektru a totéž platí pro méně intenzivní signály, nabývá symetrie hodnoty 1, pokud však signální páry nevykazují symetrii, nabývá symetrie hodnoty 0 [75].

Tyto tři získané hodnoty jsou vzájemně vynásobené a výsledek je normalizovaný na 1000. Hodnota skóre je dekadický logaritmus získaného normalizovaného výsledku. Maximální skóre může tedy dosáhnout hodnoty 3, což je dekadický logaritmus 1000 (= log 1000). Čím vyšší je získané skóre, tím vyšší je pravděpodobnost správné klasifikace druhů. Hodnoty rozsahů skóre a jejich interpretaci znázorňuje **Tab. 1** [73].

**Tab. 1** Hodnoty rozsahu skóre pro identifikaci mikroorganismů [73].

Rozsah	Interpretace	Symbody	Barva
2.000 – 3.000	Vysoká správnost identifikace	(+++)	zelená
1.700 – 1.999	Nízká správnost identifikace	(+)	žlutá
0.000 – 1.699	Identifikaci není možné provést	(-)	červená

### 2.3.1.1 Příprava vzorku

Obecně lze pro narušení buněčné stěny a extrakci proteinů použít několik základních metod. První a nejjednodušší z nich je metoda *přímého nanesení vzorku* (direct smear method), kdy jsou kolonie ve formě tenké vrstvy přímo nanášeny na MALDI-TOF desku a po zaschnutí překryty vhodnou maticí [76].

U vzorků, kde je nezbytné narušit buněčnou stěnu, se využívá 25% kyselina mravenčí nebo extrakce kombinací ethanolu, mravenčí kyseliny a acetonitrilu. V druhém případě se vzorek nejprve umístí do zkumavky s 300 µl destilované vody, do které se poté přidá 900 µl absolutního ethanolu. Po důkladném promíchání a odstranění supernatantu se pro extrakci proteinů použije 70% kyselina mravenčí a acetonitril [76].

### 2.3.1.2 Volba matrice

Termínem matrice je označena organická sloučenina, která je díky své struktuře a funkčním skupinám schopna absorbovat záření laseru o určité vlnové délce. Její volba je jedním z nejdůležitějších parametrů analýzy, neboť je zodpovědná za tvorbu iontů analytu a zajišťuje vysokou citlivost MALDI-TOF techniky. Aby bylo při analýze za pomoci MALDI-TOF dosaženo optimálních výsledků, musí matrice splňovat následující požadavky:

- schopnost absorbovat záření laseru
- ionizace analytu
- stabilita ve vakuu
- rozpustnost v rozpouštědle, které je kompatibilní s analytem
- schopnost desorpce [77, 78].

Ionizace analytu maticí může probíhat několika způsoby – protonací, deprotonací a tvorbou aduktů s ionty halogenů nebo alkalických kovů. Nejběžnějším způsobem je protonace, kdy matrice v protonované formě předá proton neutrální molekule analytu [79].

Výběr matrice se odvíjí především od typu analyzované látky, neboť díky různorodosti analytů neexistuje jedna univerzální matrice, ale naopak široká škála dle povahy zkoumaných látek. Přehled vybraných matic pro MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii je uveden v **Tab. 2** [80].

**Tab. 2** Přehled vybraných matic pro MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii [80].

Matrice	Vlnová délka	Aplikace
Kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyokořicová	UV (337 a 355 nm)	Peptidy, fragmentace
Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová	UV (337 a 355 nm)	Peptidy, proteiny, sacharidy Syntetické polymery
Kyselina sinapová	UV (337 a 355 nm)	Proteiny, peptidy
Kyselina sukcinová	IR (2,94 a 2,79 $\mu$ m)	Proteiny, peptidy
Kyselina nikotinová	UV (266 nm)	Proteiny, peptidy
Glycerol	IR (2,94 a 2,79 $\mu$ m)	Proteiny, peptidy

### 2.3.1.3 Aplikace vzorku a matrice

Existuje nespočet metod pro nanášení vzorku a matrice, přičemž každá má své výhody i nevýhody. Výběr konkrétní metody, stejně jako v případě volby matrice, se odvíjí od typu analyzované látky [77].

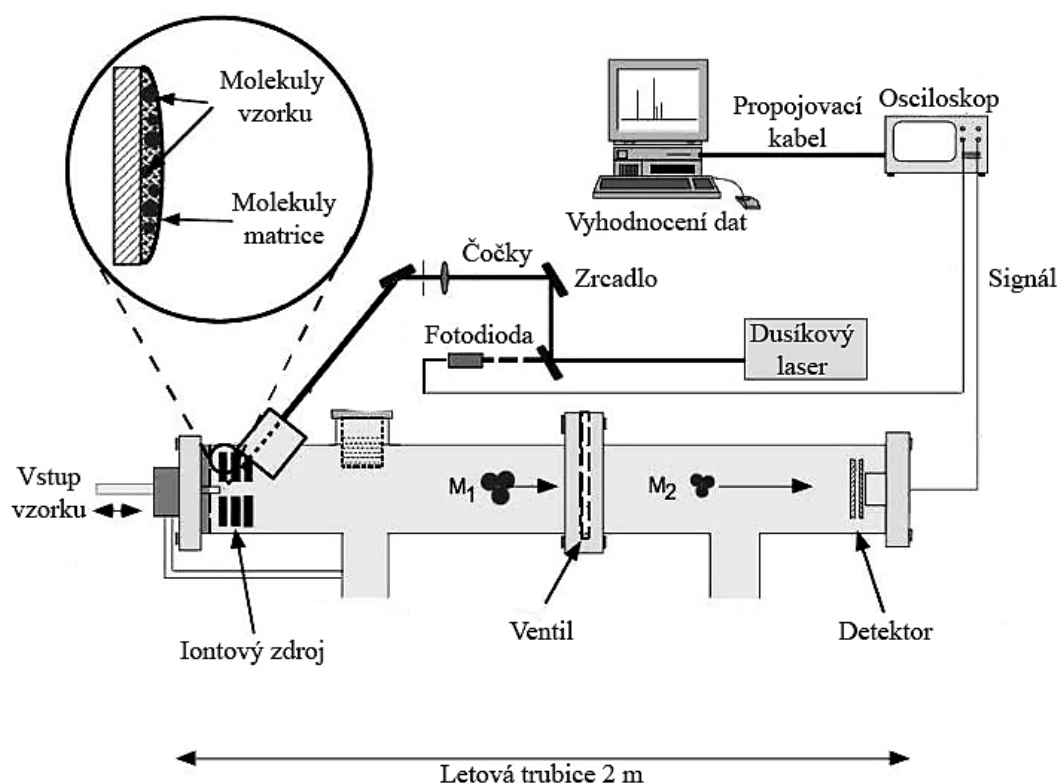
Nejpoužívanější metoda *dried-droplet* je původním způsobem aplikace vzorku a matrice. Vzorek je buď nanášen samostatně a po zaschnutí překryt maticí nebo smíchán s roztokem matrice a poté nanášen na desku, kde při laboratorní teplotě zasychá. Na obdobném principu je založena metoda *zaschnutí ve vakuu*, ale s tím rozdílem, že směs vzorku a matrice je odpařena ve vakuové komoře, čímž je zajištěna vyšší homogenita krystalů matrice, které ovlivňují i rozlišení. Mimo jiné se uplatňuje *technika vrstvení* (sandwich), kdy je analyt nanášen na vrstvu matrice a překryt druhou vrstvou matrice. Dále se využívá také metoda *rychlého*

odpaření a překrytí, při které je nejprve naneseno rozpouštědlo, po jehož zaschnutí se aplikuje směs matrice-vzorek [77, 80].

Moderní metody využívají například *dvoufázovou matici*, která představuje směs suspenze částic (například grafit), matrice a analytu. Případně může být matrice ve formě pevné podpory, což je typické pro metodu DIOS (Desorpce a ionizace za použití terčíku z porézního silikonu), která využívá porézní křemík jako pevnou podporu [77, 80].

### 2.3.1.4 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Základními komponenty MALDI-TOF hmotnostního spektrometru jsou nosič vzorku (kovová deska), laserová optika (laser a systém zrcadel a čoček), iontový zdroj, vysokonapěťový urychlovač, TOF analyzátor, detektor a vyhodnocovací zařízení. Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru s mikrokanálovým destičkovým detektorem (MCP) znázorňuje **Obr. 22** [81].



**Obr. 22** Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru v lineárním uspořádání [81].

MALDI využívá několik typů laserů, přičemž nepoužívanějším zdrojem energie pro ionizaci jsou UV-fotony emitované dusíkovým laserem o vlnové délce 337 nm a šířkou pulsu obvykle 3 ns. Kromě dusíkového laseru se používá také infračervená radiace o vlnové délce 2,94  $\mu\text{m}$  nebo CO<sub>2</sub> laser o vlnové délce 10,6  $\mu\text{m}$ . Často se využívají také tzv. solid-state UV lasery nebo Nd-YAG lasery (Neodymium-doped yttrium aluminium garnet) s vlnovou délkou 355 nm [82].

Spojení MALDI a TOF analyzátoru je dnes často využívanou technikou při identifikaci proteinů, určování molekulových hmotností a pro získávání informací o struktuře velkých molekul. Průletový analyzátor TOF (Time of flight) je konstrukčně nejjednodušší analyzátor, neboť je tvořen evakuovanou letovou trubicí různé délky (nejčastěji 1-2 m). Nejjednodušší

uspořádání TOF analyzátoru je lineární, kdy ionty prolétají letovou trubicí a dopadají přímo na detektor. V takovém případě platí, že čím delší bude letová trubice, tím se dosáhne vyššího rozlišení. Efektivnější je použití tzv. reflektoru, neboli elektrostatického zrcadla umístěného na konci letové trubice. Dráha letu iontů se prodlouží odrazem od tohoto zrcadla, přičemž ionty o vyšší hmotnosti dolétnou dále do trubice než ionty o nižší hmotnosti. Ionty se však po odrazu nevracejí po stejné dráze, ale po mírně vychýlené tak, aby dopadly na detektor [83].

Po aplikaci vzorku a matrice na MALDI-TOF desku dochází k zahájení desorpce a ionizace. Ionizace může probíhat buď ve vakuu, nebo za atmosférického tlaku. Energie laseru je absorbována molekulami matrice a část energie je přeměněna na energii tepelnou, která umožní odpaření části matrice a analytu. Excitované molekuly matrice pak ionizují molekuly vzorku přenosem protonu. Vzniklé ionty, převážně jednonásobně nabitě, jsou poté urychleny díky potenciálovému rozdílu mezi MALDI-TOF deskou a vstupem do analyzátoru. Doba letu urychlených iontů analyzátozem směrem k detektoru odpovídá jejich poměru hmotnosti a náboje. Čas v nanosekundách, který uplynul mezi pulzačním zrychlením iontů a signálem, jenž zachytil detektor, lze přepočítat na molekulovou hmotnost jednotlivých analyzovaných molekul například proteinů. Detekce je obvykle provedena pomocí MCP detektoru [81, 83].

### 2.3.2 Metody molekulární biologie

Analýza molekuly DNA jakéhokoliv mikroorganismu je zahájena její izolací z buněk. Konkrétní vybrané sekvence DNA jsou posléze amplifikovány nejčastěji metodou PCR, separovány na základě velikosti a purifikovány. Takto získané produkty jsou sekvenovány a porovnány s dostupnými databázemi [5].

#### 2.3.2.1 Izolace DNA

První krokem izolace DNA z buňky kvasinek je dezintegrace buněčné stěny. Konvenční metody využívají degradaci za použití enzymů, mechanických způsobů nebo detergentů s fenol-chloroformovou extrakcí [84].

Klasický postup izolace DNA zahrnuje nejprve použití lyzačního pufu, který je složen z Tritonu X-100, SDS, NaCl, EDTA a Tris-HCl. Následuje mechanický způsob dezintegrace buněk, kdy se suspenze buněk protřepe spolu se skleněnými kuličkami. Mechanické způsoby jsou obecně považovány za rychlejší, avšak jejich značnou nevýhodou je zvýšené riziko štěpení DNA. Samotný proces pak může být proveden ve zkumavce anebo pomocí Braunova homogenizátoru [85, 86].

Pro vyextrahování DNA se obvykle uplatňuje směs fenol-chloroform-isoamylalkohol v poměru 25:24:1, nebo pouze fenol-chloroform. Použití této směsi umožňuje rozdělení roztoku do tří fází, kdy vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny, zatímco mezifáze fenol/voda vysrážené proteiny a sacharidy. Veškeré lipidy jsou pak rozpuštěny ve fázi chloroform-isoamylalkohol. Následuje precipitace DNA pomocí ethanolu nebo isopropanolu a přečištění získané DNA tak, aby koncentrace fenolu a RNA byla co nejnižší. K odstranění RNA se používají enzymy – RNAázy. Vyizolovaná DNA se pak obvykle uchovává při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [87, 88].

Kromě výše uvedených způsobů lze využít také opakující se zmrazení-rozmrazení suspenze buněk, magnetické částice nebo benzyl chlorid a mikrovlnné záření. K izolaci DNA lze využít také komerčně dostupné extrakční nebo purifikační kity například od firmy Mo Bio, Roche, nebo Biomerieux [84, 88-90].

#### 2.3.2.2 Amplifikace DNA

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, která byla vyvinuta Kary Mullisem v 80. letech minulého století a je založena na schopnosti DNA polymerázy syntetizovat nové vlákno DNA, které je komplementární k templátovému vláknu. Jedná se prakticky o specifickou, cyklickou a exponenciální syntézu předem zvolené sekvence DNA, která je vymezena prostřednictvím dvou molekul oligonukleotidů tzv. *primerů* [87, 91].

Standardně se PCR reakce provádí v objemu 50-100  $\mu\text{l}$  reakční směsi ve zkumavkách. Základními komponenty směsi jsou templátová DNA, sada primerů, deoxynukleotid trifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), sterilní destilovaná voda a termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza, nejčastěji typu *Taq*, izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* [91, 92].

Reakce je realizována v termocykléru ve třech krocích s měnícím se teplotním profilem. Prvním krokem je denaturace templátové DNA (denaturation) při teplotě  $94\text{-}95\text{ }^{\circ}\text{C}$  trvající 30 s až 5 min, čímž se přeruší vodíkové vazby mezi bázemi a dojde k rozvolnění dvoušroubovice DNA do dvou samostatných vláken. Následuje připojení primerů k vláknu DNA (annealing) v rozsahu teplot  $45\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 20 s. Konkrétní teplota tohoto kroku je však závislá na volbě

daných primerů a jejich teplotním optimu pro hybridizaci. Třetím a závěrečným krokem je elongace (elongation), která probíhá v rozsahu teplot 55-85 °C, nejčastěji při 72 °C, což je ideální teplota pro správné fungování termostabilní DNA polymerázy. Tento enzym katalyzuje připojení jednotlivých deoxynukleotidtrifosfátů za tvorby nového komplementárního vlákna DNA. Celý cyklus je pak opakován 30-60 krát v závislosti na konkrétní aplikaci [92, 93, 94].

### 2.3.2.3 Analýza DNA

Jakmile je vybraný úsek DNA přítomen v dostatečném počtu kopií, je nezbytné tyto PCR produkty analyzovat. Existuje nespočetné množství technik k tomu účelu, avšak nejdůležitější a také nejpoužívanější jsou gelová elektroforéza, Southernův blotting, klonování a sekvenování [95].

Pro analýzu DNA **gelovou elektroforézou** se nejčastěji používá agarózový gel o koncentraci 0,5-2,0 % agarózy. Vzhledem k tomu, že molekula DNA disponuje záporným nábojem díky fosfátovým skupinám, po připojení ke zdroji napětí migruje DNA v pórech gelu směrem od katody k anodě. Díky uniformnímu poměru hmotnost/náboj jsou fragmenty DNA separovány v gelu na základě velikosti (počtu párů bází) a tvoří zóny, které lze vizualizovat pomocí UV záření a barviva ethidium bromidu. Celý proces lze realizovat buď v klasickém elektroforetickém zařízení, nebo pomocí chipů, kdy se jedná o tzv. *on-chip elektroforézu*, která je podstatně rychlejší, ale nákladnější variantou konvenční elektroforézy [96-98].

K určení přesného složení bází dané sekvence a topologii DNA/RNA se využívají techniky **sekvenování**, které jsou klasifikovány do tří generací. Vůbec první známou metodou je *Sangerova metoda*, která je založena na principu replikace DNA a využívá modifikované dideoxynukleotidtrifosfáty (ddNTPs), které nemají 3'-OH skupinu. Po jejich připojení k templátu dojde k zastavení replikace. Celý proces probíhá ve čtyřech separovaných reakcích, přičemž v každé zkumavce je obsažen jeden ze čtveřice ddNTPs [96].

Další technikou první generace je *Maxam-Gilbertova metoda*, při které se uplatňuje chemické štěpení jednotlivých typů bází ssDNA fragmentu, který je radioaktivně značen na 5' konci. Reakce je realizována ve čtyřech zkumavkách, kde jsou na základě specifického štěpení obsaženy fragmenty různé délky, které jsou posléze separovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu [99].

Sekvenování druhé generace zahrnuje *pyrosekvenování* a z něho vycházející *454 sekvenování*. Pyrosekvenování je založeno na snímání aktivity DNA polymerázy, která syntetizuje komplementární vlákno k ssDNA templátu v přítomnosti chemiluminiscenčního enzymu. K imobilizovanému templátu ve zkumavce jsou postupně přidávány roztoky s jednotlivými bázemi. Pyrofosfát, který se uvolní po navázání nukleotidu, je detekován [96].

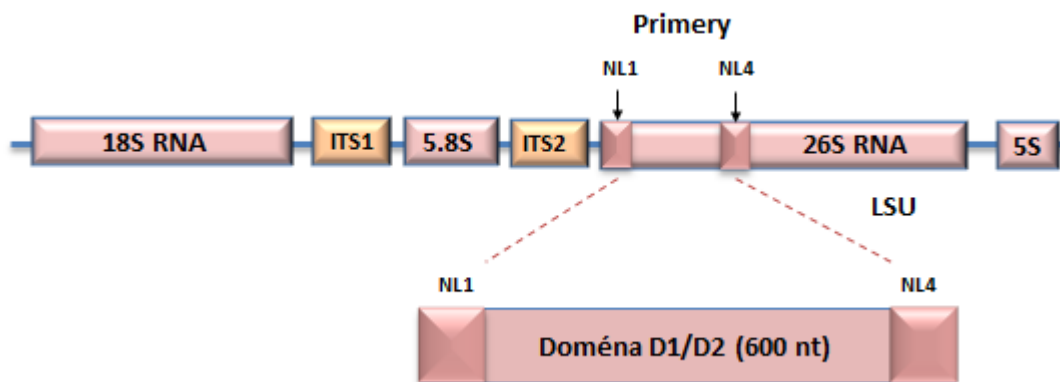
Třetí generace sekvenování se soustředí především na zkrácení času analýzy, prodloužení délky úseku DNA, který lze sekvenovat a snížení ceny analýzy, použitím méně nákladných procedur. Příkladem sekvenování třetí generace je *RNAP sekvenování*, vizualizace DNA prostřednictvím *elektronového mikroskopu* nebo *sekvenování na principu hybridizace* [96].

#### 2.3.2.4 Molekulární identifikace kvasinek

Kvasinky jsou nejčastěji molekulárně identifikovány metodou sekvenování oblastí genů SSU, LSU rRNA a tzv. ITS1 a ITS2 úseků. Znalost těchto sekvencí pak umožňuje jejich porovnání s dostupnými databázemi a rozpoznání daného kmene [5].

Odlišit askomycetní kvasinky od bazidiomycetních lze také na základě analýzy poměru cytosinu a guaninu (C+G) nDNA v mol %. V případě askomycetních kvasinek je poměr C+G v rozsahu 28-50 mol %, zatímco u bazidiomycetních kvasinek 50-70 mol %. V závislosti na použité analytické technice se obvykle uvádí, že kmeny lišící se o hodnotu 1-2 mol % jsou identifikovány jako odlišné kmeny [100].

V současné době je pro identifikaci veškerých známých askomycetních i bazidiomycetních kvasinek rozhodující sekvenování domény D1/D2 na 5' konci LSU (26S) rRNA (**Obr. 23**) [5, 101].



**Obr. 23** Schématické znázornění oblastí 26S, ITS, ITS2 a domény D1/D2 pro sekvenování v rámci molekulární identifikace kvasinek [102].

Zpočátku byla sekvenována pouze doména D2 velké podjednotky (26S) rRNA, neboť byla dostatečně variabilní a postačovala k rozlišení blízkých příbuzných kmenů. Postupně však k sekvenování domény D2 přibyla i doména D1. Celkově tak tento úsek čítá přibližně 600 nukleotidů a je vymezen primery NL1 a NL4 (**Obr. 23**). Všeobecně je stanoveno, že kmeny stejného druhu vykazují rozdíl 0-0,5 % v obsahu nukleotidů, což odpovídá počtu 0-3 nukleotidů. Naopak kmeny, které se odlišují ve více než 6 nesousedících nukleotidech (1 %) jsou identifikovány jako kmeny různých druhů. Totéž platí pro kmeny, jejichž rozdíl v obsahu nukleotidů se nachází v „přechodné“ oblasti a liší se tedy ve 4 až 5 nukleotidech [100].

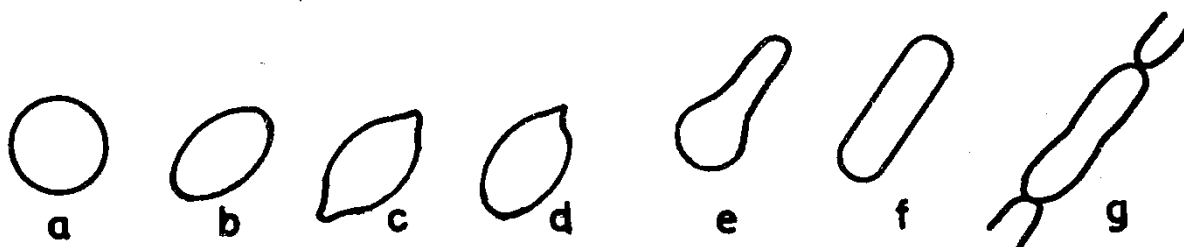
Oblasti ITS1 a ITS2, které jsou odděleny úsekem 5.8S rRNA (**Obr. 23**), jsou také často používány pro identifikaci kvasinek. U některých zástupců bazidiomycetních kvasinek sekvenování této oblasti vítězí nad doménou D1/D2, ale pro správnou a jistou identifikaci velmi blízkých příbuzných kmenů je doporučováno provést sekvenování obou těchto sekvencí, tedy domény D1/D2 i ITS oblastí [100].

## Konvenční mikrobiologické metody

### 2.3.2.5 Mikroskopické pozorování buněk

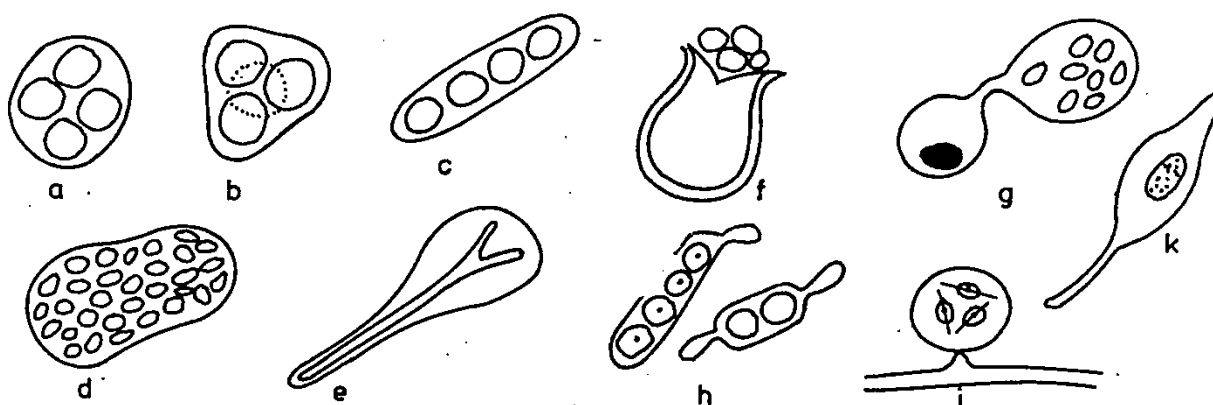
Velikost buněk kvasinek se pohybuje pod hranicí viditelnosti pouhým okem, a proto je k pozorování a posouzení tvaru buněk nezbytné použít světelný mikroskop. Morfologie buněk kvasinek může být velmi rozmanitá a to především díky vlivu okolního prostředí – složení kultivačního média a jeho kyselosti, povrchovému napětí, oxidačně-redukčnímu potenciálu, ale také díky kompozici buněčné stěny, která se odvíjí od hodnoty pH, teploty, dostupnosti kyslíku a zdroje uhlíku. Nezanedbatelný vliv na morfologii buněk má také stáří jednotlivých buněk a to, v jaké fázi buněčného cyklu se buňky právě nacházejí [5, 103, 104].

Obecně je za základní tvar buněk považován rotační elipsoid. Ostatní tvary představují odchylky od základního tvaru a mohou být dvojího druhu: buď dochází ke změně na kulatý tvar, nebo naopak do protáhlé až vláknité podoby. Jednotlivé tvary kvasinkových buněk jsou uvedeny na **Obr. 24** [103].



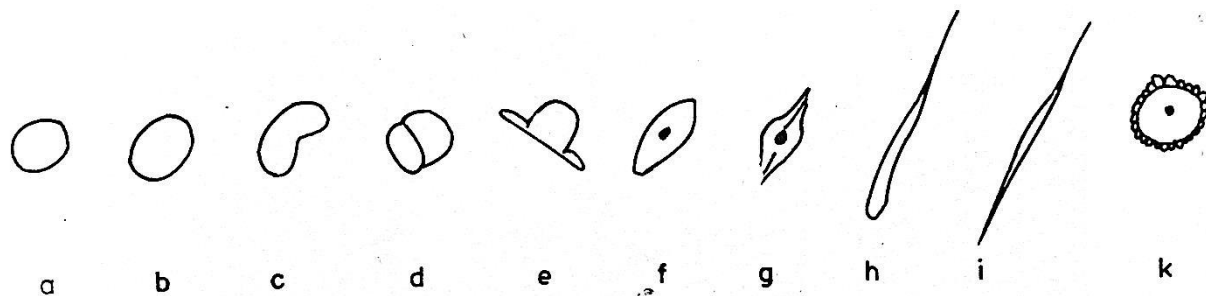
**Obr. 24** Tvary buněk kvasinek: a) kulovité, b) elipsoidní, c) citrónovité, d) ogivální, e) lahvovité, f) protáhlé, g) vláknité [103].

V případě pozorování askomycetních kvasinek je nezbytné sledovat i sexuální reprodukci – přítomnost vřecka (askus) a askospor. Vřecko může nabývat různých tvarů, které jsou zobrazeny na **Obr. 25** [105].



**Obr. 25** Tvary a typy vřecka (askus): a) kulovitý, elipsoidní (*Saccharomyces*), b) romboedrický (*Saccharomyces*), c) lineární uspořádání askospor (*Saccharomyces*), d) mnohospórový askus (*Kluyveromyces*), e) askus s rozpolcenou askosporou (*Metschnikowia*), f) askus s tubulem (*Pachysolen*), g) askus kvasinek rodu *Lipomyces*, h) dvou a čtyřspórový askus s přívěsky (*Pichia*), i) askus kvasinek rodu *Saccharomycopsis*, j) askus kvasinek rodu *Arthroascus* [105].

Stejně jako u vřecha, tak i v případě askospor existuje několik různých variant tvarů, které jsou znázorněny na **Obr. 26** [105].



**Obr. 26** Typy askospor: a) kulaté, b) elipsoidní, c) zahnutý, d) polokulovité, e) kloboukovité, f) čočkovité s kapkou tuku, g) saturnovité s prstencem, h) s rozšířeným koncem, i) jehlicovité, k) askospory s drsnou stěnou [105].

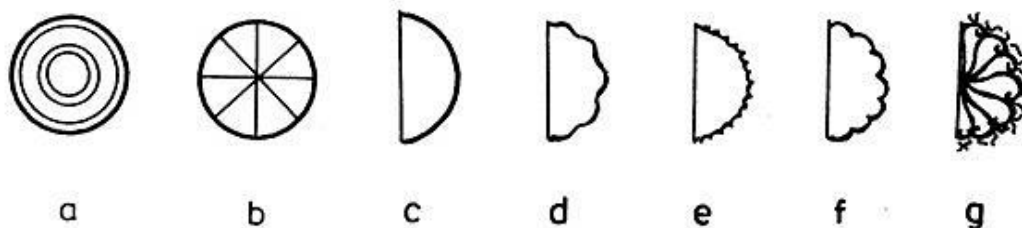
### 2.3.2.6 Vzhled kolonií na pevném médiu

V případě růstu kvasinek na pevném médiu lze vzhled kolonie popsat na základě několika hledisek:

- charakter povrchu
- okraje kolonie
- průřez (profil) kolonie
- barva kolonie [103]

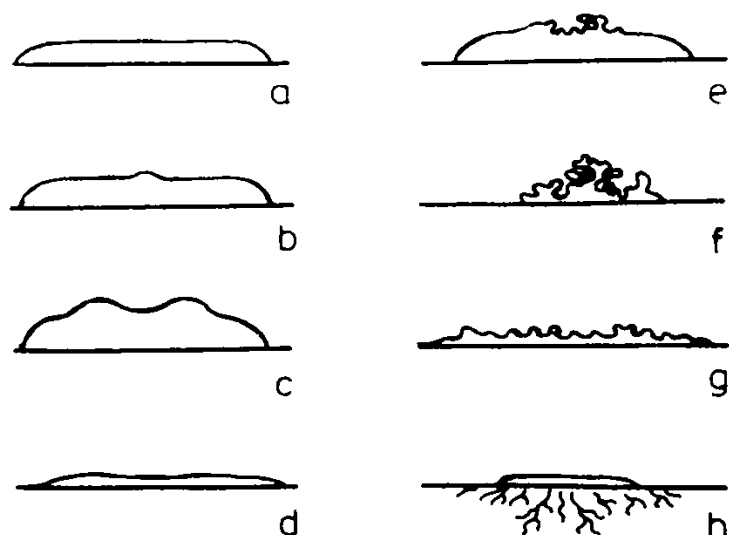
Obecně se vzhled kolonií nejčastěji posuzuje jako hladký (*smooth*), drsný (*rough*) nebo slizovitý (*mucous*) [103].

Povrch kolonií může být hladký, hladký s vyvýšeným středem a prohlubní (kráterovitý), případně různými způsoby rýhovaný. Okraje kolonií mohou být buď celistvé (ucelené), zvlněné (lalokovité), pilovité, cípovité nebo kořínkovité. Přehled rýhování povrchu a tvarů okrajů kolonií znázorňuje **Obr. 27** [103].



**Obr. 27** Přehled rýhování povrchu a tvarů okrajů kolonií kvasinek: a) centrální rýhování, b) radiální rýhování, c) celistvý okraj, d) zvlněný okraj, e) pilovitý okraj, f) cípovitý okraj, g) kořínkovitý okraj [103].

Průřez (profil) kolonií může být opět různorodý – hladký, hladký s vyvýšeným středem, hladký (kráterovitý), plochý, kráterovitý (ve středu kučeravý), vyvýšený (kučeravý), plochý (kučeravý) a nebo kořínkovitý s pseudomyceliem. Veškeré zmíněné varianty jsou uvedeny na **Obr. 28** [105].



**Obr. 28** Varianty průřezů (profilů) kolonií kvasinek: a) hladký, b) hladký s vyvýšeným středem, c) hladký-kráterovitý, d) plochý, e) kráterovitý-ve středu kučeravý, f) vyvýšený-kučeravý, g) plochý-kučeravý, h) kořinkovitý s pseudomyceliem [105].

Charakter kolonií na tuhém agaru ovlivňuje také tvar a velikost samotných buněk, například zástupci rodu *Torulopsis* tvoří kulaté buňky malých rozměrů a jejich kolonie jsou tak kompaktní a hladké. Naopak kmeny rodu *Candida* nebo *Pichia*, jejichž buňky jsou protáhlé a dosahují větších rozměrů, tvoří velké, drsné a kožovité kolonie [103].

Kromě tvaru a velikosti buněk hraje důležitou roli také sporulace a spontánní mutace, způsobené přirozenými mutageny například zvýšenou teplotou, peroxidem vodíku nebo viditelným světlem. Mutace se na povrchu kolonií projevují jako papily nebo viditelně odlišné sektory [103].

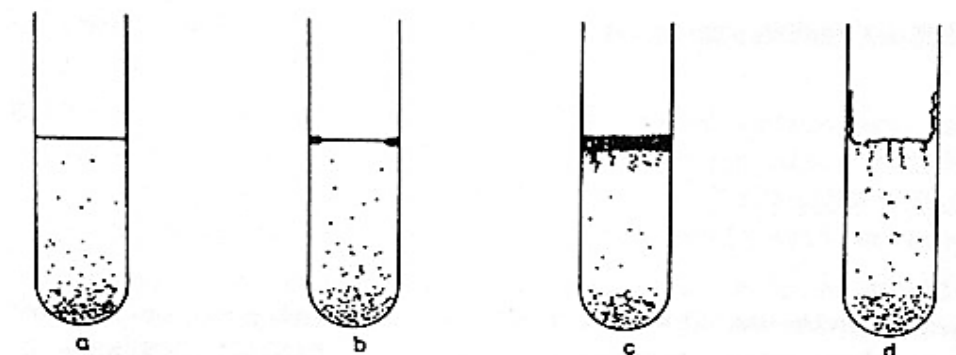
Mnoho kmenů kvasinek je pigmentováno a mohou být tak rozlišeny i na základě barvy kolonií na pevném agaru. Například *Saccharomyces cerevisiae* tvoří krémově zbarvené kolonie, zástupce rodu *Geotrichum* – *Geotrichum candidum* bílé a naopak *Aureobasidium pullulans* černé kolonie. Červená barva je charakteristická pro druh *Rhodotorula rubra*, oranžová pro druh rodu *Rhodosporidium* a žlutá pro *Cryptococcus laurentii* [106].

### 2.3.2.7 Vzhled kultury v tekutém médiu

Prvotním znakem růstu kvasinek v tekutém médiu je tvorba zákalu. Postupným rozmnožováním a stárnutím buněk se začínají tvořit shluky buněk, které klesají ke dnu zkumavky a tvoří sediment. Na základě velikosti shluků buněk a způsobu usazování se rozlišují tzv. kompaktní, zrnité a práškovité usazeniny [103].

Při kultivaci kvasinkových mikroorganismů s vysokými nároky na přístup kyslíku se při hladině média tvoří tzv. mázdra, tedy charakteristická slizká vrstva, kterou tvoří například vinné kvasinky sherry. Kromě mázdry může být na hladině média patrná tenká blána (kožka) [103].

Kvasinky, které nevyžadují příliš kyslíku, vytvářejí buď charakteristický prstenec, nebo ostrůvky mázdry. V případě rodů *Candida*, *Trichosporon* atd. se na povrchu média tvoří velmi pevný až několik milimetrů hrubý povlak s kožovitou konzistencí. Varianty možného růstu kvasinek v kapalném médiu jsou uvedeny na **Obr. 29** [103].



**Obr. 29** Typy růstu v kapalném médiu: a) zákal a usazenina (sediment), b) usazenina a prstenec, c) usazenina a hrubá kožka, d) usazenina a tenká, zvrásněná, po stěnách rostoucí kožka [105].

### 2.3.2.8 Stanovení konstanty radiálního růstu

Vzájemné porovnání kmenů lze provést i na základě rychlosti, s jakou kolonie narostly na tuhém agaru, ale pouze do plochy nikoliv do výšky, neboť výška v rámci celé kolonie není konstantní. Pro posouzení rychlosti nárůstu kolonií se používá tzv. *konstanta radiálního růstu*  $k_r$ , kterou lze vypočítat podle následujícího vztahu [103, 105]:

$$k_r = \frac{r_t - r_0}{t - t_0} \cdot 100, \quad (1)$$

kde  $r_t$  je průměr ok v mm po 21 denní kultivaci při 20 °C,  $r_0$  je průměr ok v mm po 24 hod kultivace při 20 °C,  $t$  je celková doba kultivace v hod,  $t_0$  je doba kultivace při stanovení hodnoty  $r_0$  v hod. Výsledek je udáván v mm po dané době kultivace v hod při 20 °C [105].

### 2.3.2.9 Stanovení přítomnosti ureázy

Ureázový test (*rapid urea test*) slouží k detekci enzymu ureázy, který katalyzuje hydrolýzu molekuly močoviny za vzniku amoniaku a karbamátu. Karbamát je však nestálý a podléhá hydrolýze, přičemž vzniká kyselina uhličitá a další molekula amoniaku [5]. Vznikající amoniak způsobuje zvýšení hodnoty pH a barevnou změnu indikátoru – fenolové červeně z jantarově žluté (pH 6,8) na růžovo-fuchsiovou barvu (pH 8,1), (**Obr. 30**) [5, 107, 108].



**Obr. 30** Stanovení přítomnosti ureázy: a) pozitivní reakce, b) negativní reakce [108].

Test může být proveden jak na tuhém médiu (Christensenův agar), tak i v tekutém médiu. Reakce u kvasinek na tuhém médiu probíhá mnohonásobně pomaleji než u bakterií a pozitivní výsledek je pozorován během 18 až 48 hod od začátku testu. Naopak v tekutém médiu jsou u některých kvasinek výsledky zřetelné již během 2 hod, u všech ostatních kmenů do 4 hod od začátku testu [5, 109].

Stanovení přítomnosti ureázy vykazuje pozitivní reakci u rodů basidiomycetních kvasinek například *Cryptococcus* nebo *Rhodotorula*, které jsou pak označeny jako *ureáza-pozitivní*. Naopak u rodů askomycetních kvasinek například *Candida*, *Saccharomyces* nedochází ke změně barvy média, a tudíž je reakce negativní. Tyto rody pak nesou označení *ureáza-negativní*. Výjimku však tvoří druh *Yarrowia (Candida) lipolytica*, vybrané kmeny *Candida krusei*, druh *Schizosaccharomyces pombe* a zástupci rodu *Lipomyces*, kteří ačkoliv patří mezi askomycetní kvasinky, vykazují pozitivní reakci na přítomnost ureázy [5, 107].

### 2.3.2.10 Kvašení

Existuje několik různých testů pro detekci vznikajícího oxidu uhličitého při fermentaci, ale jako nejvíce osvědčená metoda pro rutinní účely se jeví použití tzv. *Durhamovy plynové zkumavky* naplněné 2% roztokem daného sacharidu. Durhamovy zkumavky jsou zkumavky o menší velikosti, které se vkládají do klasických zkumavek a jsou schopny zachytit jakýkoliv vznikající plyn. Pro konvenční stanovení se používají tyto sacharidy: D-glukóza, D-galaktóza, sacharóza, maltóza, laktóza, rafinóza a trehalóza. Mezi další sledované substráty patří například inulin, škrob, melibióza, celobióza a xylóza [5].

Ačkoliv se fermentační testy dříve dlouhou dobu využívaly pro typizaci kvasinek, jejich výsledky jsou často považovány za nespolehlivé a nejednoznačné, neboť interpretace fermentace v Durhamově zkumavce může být zkomplikována například kontaminací substrátu, aerobním metabolismem substrátu nebo flokulací. I přes uvedené skutečnosti má tato klasická metoda stále své využití například při rozlišení kmenů pivovarských kvasinek *S. cerevisiae* na základě hydrolýzy melibiózy, nebo při předběžné identifikaci kmenů kvasinek [104].

Kvašení určitých substrátů je možné dokázat i postupně na základě několika ověřených tvrzení:

- pokud kmen nekvasí glukózu, tak nekvasí žádný jiný sacharid
- pokud kmen kvasí glukózu, tak kvasí i fruktózu a manózu
- v případě, že kvasí maltózu, nekvasí laktózu a naopak [105].

Na základě kvašení maltózy a sacharózy se rozdělují čtyři kvasné typy:

- *Typ I* – kvasí maltózu a nekvasí sacharózu (M+S-)
- *Typ II* – kvasí maltózu a kvasí sacharózu (M+S+)
- *Typ III* – nekvasí maltózu a kvasí sacharózu (M-S+)
- *Typ IV* – nekvasí maltózu a nekvasí sacharózu (M-S-) [105].

V třetím kvasném typu se může navíc kvasit i laktóza a ve čtvrtém kvasném typu se může a nemusí kvasit glukóza [105].

### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo identifikovat a zařadit do skupin na úrovni druhu celkem 84 kmenů askomycetních kvasinek pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a metody sekvenace domény D1/D2 26S rRNA genu.

U zvolených kmenů byly konvenčními mikrobiologickými metodami stanoveny vybrané charakteristiky kvasinek – vzhled kolonií na pevném médiu a kultury v tekutém médiu, mikroskopické pozorování buněk, kvašení, stanovení přítomnosti ureázy a konstanty radiálního růstu.

Veškerá naměřená hmotnostní spektra byla poskytnuta Sbírce kultur kvasinek (CCY) jako referenční spektra pro alternativní a rychlou identifikaci nových izolátů kvasinek.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Seznam kmenů kvasinek pro biotypizaci

Tab. 3 Seznam kmenů kvasinek pro biotypizaci.

Číslo CCY	Druh	Původ (substrát a lokalita)	Pozn.
029-002-009	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Plody ostružiníku ( <i>Rubus</i> ) Malé Karpaty (SR) <sup>1</sup>	
029-002-014	<i>M. pulcherrima</i>	Suchokvět roční ( <i>Xeranthemum annuum</i> ), Devínska Kobyla (SR)	
029-002-015	<i>M. pulcherrima</i>	Turan ostrý ( <i>Erigeron acre</i> ), Zvolenská Slatina (SR)	
029-002-016	<i>M. pulcherrima</i>	Rýt žlutý ( <i>Reseda lutea</i> ), Senec (SR)	
029-002-020	<i>M. pulcherrima</i>	Prvosenka jarní ( <i>Primula veris</i> ), Kováčovské kopce (SR)	
029-002-021	<i>M. pulcherrima</i>	Jahodník obecný ( <i>Fragaria vesca</i> ), Kováčovské kopce (SR)	
029-002-024	<i>M. pulcherrima</i>	Kozlík lékařský ( <i>Valeriana officinalis</i> ), Kováčovské kopce (SR)	
029-002-027	<i>M. pulcherrima</i>	Pupava bezlodyžná ( <i>Carlina acaulis</i> ), Oravské Podhradie (SR)	
029-002-028	<i>M. pulcherrima</i>	Pupava obecná ( <i>Carlina vulgaris</i> ), Karlova Ves (SR)	
029-002-052	<i>M. pulcherrima</i>	Zlatice převyslá ( <i>Forsythia suspensa</i> ), Mlyňany (SR)	
029-002-119	<i>M. pulcherrima</i>	Voda z jezera, Jakubov (SR)	
029-002-120	<i>M. pulcherrima</i>	Voda z jezera, Jakubov (SR)	

Tab. 4 Pokračování.

Číslo CCY	Druh	Původ (substrát a lokalita)	Pozn.
029-002-121	<i>M. pulcherrima</i>	Voda z rybníka, Jakubov (SR)	
029-002-122	<i>M. pulcherrima</i>	Voda z řeky Dunaj, Bratislava (SR)	
029-002-125	<i>M. pulcherrima</i>	Zemědělská půda, Malé Leváre (SR)	
029-002-127	<i>M. pulcherrima</i>	List Javoru babyka ( <i>Acer campestre</i> )	
029-002-129	<i>M. pulcherrima</i>	List Meruňky obecné ( <i>Prunus armeniaca</i> ), Malé Zálužie (SR)	S
029-002-131	<i>M. pulcherrima</i>	Květ Jabloně domácí ( <i>Malus domestica</i> ), Malé Zálužie (SR)	

029-002-133	<i>M. pulcherrima</i>	Květ Hrušně obecné ( <i>Pyrus communis</i> ), Malé Leváre (SR)	
029-002-135	<i>M. pulcherrima</i>	Květ Slivoně švestky ( <i>Prunus domestica</i> ), Malé Leváre (SR)	
029-002-138	<i>M. pulcherrima</i>	Plod Hrušně obecné ( <i>Pyrus communis</i> ), Bratislava (SR)	
029-002-141	<i>M. pulcherrima</i>	List plodů Meruňky obecné, Malé Zálužie (SR)	
029-002-142	<i>M. pulcherrima</i>	List Slivoně švestky ( <i>Prunus domestica</i> ), Malé Zálužie (SR)	
029-002-143	<i>M. pulcherrima</i>	Květ Jabloně domáci ( <i>Malus domestica</i> ), Malé Zálužie (SR)	S <sup>2</sup>

**Tab. 5** Pokračování.

Číslo CCY	Druh	Původ (substrát a lokalita)	Pozn.
025-006-026	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	List Hrušně obecné ( <i>Pyrus communis</i> ), Malé Leváre (SR)	
025-006-031	<i>H. uvarum</i>	Plod Jabloně domáci ( <i>Malus domestica</i> ), Bratislava (SR)	
025-006-034	<i>H. uvarum</i>	Vinný mošt (po 7denní fermentaci); odrůda Veltlínské zelené, Strekov (SR)	S
046-001-002	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	Voda z jezera, Plavecký Štvrtok (SR)	
046-001-003	<i>H. guilliermondii</i>	Plod Slivoně švestky ( <i>Prunus domestica</i> ), Malé Leváre (SR)	S
046-001-005	<i>H. guilliermondii</i>	Plod Hrušně obecné ( <i>Pyrus communis</i> ), Malé Zálužie (SR)	
029-009-028	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Voda z jezera, Plavecký Štvrtok (SR)	S
029-009-045	<i>P. kudriavzevii</i>	Plod Hrušně obecné ( <i>Pyrus communis</i> ), Malé Zálužie (SR)	
029-009-026	<i>P. kudriavzevii</i>	Povrch sýra typu camembert	
039-004-002	<i>P. fermentans</i>	Máslo, Holandsko	T <sup>3</sup> , S
039-004-006	<i>P. fermentans</i>	Voda z řeky Moravy, Bratislava (SR)	
039-004-005	<i>P. fermentans</i>	Potraviny, Japonsko	

**Tab. 6** Pokračování.

Číslo CCY	Druh	Původ (substrát a lokalita)	Pozn.
029-038-072	<i>Pichia jadinii</i>	Krmné droždí, (ČR)	S
029-038-075	<i>Pichia jadinii</i>	Krmné droždí, (ČR)	
029-038-081	<i>Pichia jadinii</i>	Krmné droždí, (ČR)	
039-023-012	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	List Pcháče rolního ( <i>Cirsium arvense</i> ), Pernek (SR)	S
039-023-003	<i>M. guilliermondii</i>	Voda z řeky Dunaj, Bartislava (SR)	
039-023-005	<i>M. guilliermondii</i>	List Slivoně švestky ( <i>Prunus domestica</i> ), Malé Leváre (SR)	
038-001-034	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Jehličí Smrku ztepilého ( <i>Picea abies Karst.</i> ), Železná Studnička (SR)	
038-001-035	<i>W. anomalus</i>	List Slivoně švestky ( <i>Prunus domestica</i> ), Malé Zálužie (SR)	S
038-001-037	<i>W. anomalus</i>	Květ Broskvoně obecné ( <i>Prunus persica</i> ), Malé Zálužie (SR)	
041-006-021	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Plod Meruňky obecné ( <i>Prunus armeniaca</i> ), Malé Zálužie (SR)	S
041-006-025	<i>D. hansenii</i>	Půda v blízkosti Jabloně domácí ( <i>Malus domestica</i> ), Malé Leváre (SR)	
026-009-022	<i>D. hansenii</i>	Vody z řeky Moravy, Bratislava (SR)	

**Tab. 7** Pokračování.

Číslo CCY	Druh	Původ (substrát a lokalita)	Pozn.
029-001-022	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	Chřpa latnatá ( <i>Centaurea stoebe</i> ), Karlova Ves (SR)	S
029-001-017	<i>M. reukaufii</i>	Štírovník růžkatý ( <i>Lotus corniculatus</i> ), Modrý Kameň (SR)	
029-001-021	<i>M. reukaufii</i>	Ostrožka stračka ( <i>Consolida regalis</i> ), Rusovce (SR)	
039-031-009	<i>Pichia kluyveri</i>	Plod Jabloně domácí ( <i>Malus domestica</i> ), Malé Zálužie (SR)	
039-031-004	<i>P. kluyveri</i>	Plody vinné révy, odrůda Svatý Vavřinec	
039-031-019	<i>P. kluyveri</i>	Půda v blízkosti Broskvoně obecné ( <i>Prunus persica</i> ), Velké Pavlovice (ČR)	S
Půda 83	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Půda zpod ovocného stromu (Meruňka obecná, <i>Prunus armeniaca</i> ), Malé Zálužie (SR)	S

Půda 78	<i>T. delbrueckii</i>	Půda zpod ovocného stromu (Jabloň domácí, <i>Malus domestica</i> ), Malé Zálužie (SR)	
021-022-008	<i>T. delbrueckii</i>	Voda z rybníka, Železná Studnička, Bratislava (SR)	
035-006-007	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Plod Hrušně obecné ( <i>Pyrus communis</i> ), Malé Leváre (SR)	S
035-006-005	<i>Z. bailii</i>	Kontaminované bílé víno, Topoľčianky (SR)	
035-006-003	<i>Z. bailii</i>	Červené víno, Anglie	

**Tab. 8** Pokračování.

Číslo CCY	Druh	Původ (substrát a lokalita)	Pozn.
021-004-109	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	List Javoru babyka ( <i>Acer campestre</i> L.), Železná Studnička, Bratislava (SR)	S
021-004-105	<i>S. cerevisiae</i>	Řeka Morava, Bratislava (SR)	S
021-004-102	<i>S. cerevisiae</i>	Řeka Dunaj, Bratislava (SR)	
021-004-108	<i>S. cerevisiae</i>	Jehličí Borovice lesní ( <i>Pinus silvestris</i> L.), Železná Studnička, Bratislava (SR)	
021-004-123	<i>S. cerevisiae</i>	Květ Meruňky obecné ( <i>Prunus armeniaca</i> L.), Malé Zálužie (SR)	
021-004-129	<i>S. paradoxus/ cerevisiae</i>	Plod Slivoně švestky ( <i>Prunus domestica</i> ), Bratislava (SR)	
021-013-001	<i>S. bayanus</i>	Zakalené (nefiltrované) pivo	T, S
021-013-005	<i>S. bayanus</i>	7. den překvašení moštu, Velké Pavlovice (ČR)	
000-048-035	<i>S. pastorianus</i>	Pivovar Braník, (ČR)	
000-048-060	<i>S. pastorianus</i>	Brewery Ottakring, Vídeň, Rakousko	
051-001-001	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Jogurt, SRN	S
029-008-008	<i>Kl. lactis</i>	Původ neznámý	S

**Tab. 9** Pokračování.

Číslo CCY	Druh	Původ (substrát a lokalita)	Pozn.
029-008-010	<i>Kl. marxianus</i>		
050-002-002	<i>Kl. marxianus</i>		
043-011-001	<i>Kl. marxianus</i>		
029-002-144			

029-002-139	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Plod Hrušně obecné ( <i>Pyrus communis</i> )
021-004-135		
021-004-122		
021-031-005		
021-013-004		
046-001-007		
025-006-028		
025-006-036		

<sup>1</sup>SR – Slovenská republika, <sup>2</sup>S-Sekvenovaný kmen, <sup>3</sup>T-Typový kmen

## 4.2 Použité přístroje a chemikálie

### 4.2.1 Použité přístroje a příslušenství

- Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme s MTP 384 Target Plate Polished Steel TF (Target plate with transponder technology), Bruker Daltonik GmbH (SRN)
- PC HP Z400 Workstation, Hewlett-Packard (USA)
- Notebook HP 6730b, Hewlett-Packard (USA)
- Laminární box MSC-Advantage<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
- Kahan Fuego SCS Basic, WLD-TEC GmbH (SRN)
- Parní sterilizátor PS20a, CHIRANA, a.s. (SR)
- Cykler SureCycler 8800, Agilent Technologies (USA)
- Bioanalyzátor 2100 s čipovou primovací stanicí (Priming station), DNA chipy a čističem elektrod (Electrode Cleaner), Agilent Technologies (USA)
- Centrifuga Mikro 200, Hettich Lab Technology (SRN)
- Centrifuga Mini Spin, Eppendorf AG (SRN)
- Vortex mixer Genie® 2, MO-BIO Laboratories, Inc., (USA)
- Vortex mixer Reax Top, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, (SRN)
- Vortex mixer ZX Classic, VELP Scientifica, (Italská republika)
- Analytické váhy ABT 120-4M, Kern & Sohn GmbH, (SRN)
- Předvážky Kern 440-33, Kern & Sohn GmbH, (SRN)
- Mikroskop Nikon Eclipse 80i s fotoaparátem Nikon DS-Fi1, Nikon Corporation (Japonsko)
- Fotoaparát Nikon D5100, Nikon Corporation (Japonsko)
- Mikropipety Eppendorf Research (100-1000 µl, 10-100 µl), Eppendorf AG (SRN)
- Mikropipety Eppendorf Research plus (100-1000 µl, 0,5-10 µl), Eppendorf AG (SRN)
- Mikropipety Biohit M1000 a M100, Sartorius AG (SRN)
- Špičky pro pipety, Sarstedt AG & Co. (SRN)
- Špičky pro pipety TipOne®, STARLAB INTERNATIONAL GmbH (SRN)
- Mikrozukumavky, Sarstedt AG & Co. (SRN)
- Mikrozukumavky MicroBead Tubes, MO-BIO Laboratories, Inc. (USA)
- Mikrozukumavky s kolonkou (Spin Filters Units in 2 ml Tubes), MO-BIO Laboratories, Inc. (USA)
- Mikrozukumavky Collection Tubes, MO-BIO Laboratories, Inc. (USA)
- Petriho misky, VWR® International (USA)
- Stopky Oregon Scientific, Oregon Scientific, Inc. (USA)

#### 4.2.2 Použité chemikálie

- Kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (Matrix substance for Maldi-MS,  $\geq 99\%$ , HPLC), Fluka analytical, Sigma Aldrich (Nizozemí)
- Fluka Acetonitril LC-MS CHROMASOLV<sup>®</sup>,  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich (Nizozemí)
- Kyselina trifluorooctová (pro syntézu), Merck KGaA(SRN)
- Kyselina ferulová (trans-ferulic acid, Matrix substance for MALDI-MS,  $\geq 99\%$ , HPLC), Fluka analytical, Sigma Aldrich (Nizozemí)
- Kyselina sinapová (Matrix substance for MALDI-MS,  $\geq 99\%$ , (T)), Fluka analytical, Sigma Aldrich (Nizozemí)
- Kyselina mravenčí (pro analýzu 98-100%), Merck, KGaA, Schuchardt (SRN)
- Ethanol 96,3% p. a., Slavus (SR)
- ProteoMass<sup>™</sup> Cytochrom c MALDI-MS Standard, Sigma-Aldrich (Nizozemí)
- UltraClean<sup>®</sup>, Microbial DNA Isolation Kit, MO-BIO Laboratories, Inc. (USA)
  - Lyzační (tlumivý) roztok MicroBead Solution
  - Roztoky MD1, MD2, MD3, MD4, MD5
- StrataPrep PCR Purification Kit, Agilent Technologies (USA)
  - Roztok DNA Binding Solution 5 ML
  - Promývací roztok Wash Buffer (5X)
- Agilent DNA 7500 Reagents (for use with the Agilent 2100 bioanalyzer), Agilent Technologies (USA)
  - DNA 7500 Ladder , DNA 7500 Markers, DNA Dye Concentrate, DNA 7500 Gel Matrix
- Primery NL1 a NL4, Elisabeth Pharmacon (ČR)
- KapaTaq DNA polymeráza s pufrem, Kapabiosystem, Elisabeth Pharmacon (ČR)
- KAPA dNTP Mix, Elisabeth Pharmacon (ČR)
- D-glukóza monohydrát p. a., Slavus (SR)
- D-maltóza monohydrát čistá, Lachema N. P., Chemapol (ČR)
- Sacharóza čistá, Lachema N. P., Chemapol (ČR)
- Laktóza p.a., Lachema N. P., Chemapol (ČR)
- D-galaktóza čistá, Lachema N. P., Chemapol (ČR)
- D(+)-rafinóza pentahydrát 99+%, Acros Organics (USA)
- Močovina p.a., Lachema N. P., Chemapol (ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný čistý, Lachema N. P., Chemapol (ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný p. a., Lachema N. P., Chemapol (ČR)
- Fenolová červeň
- Extrakt z kvasnic (granulovaný, pro mikrobiologii), Merck KGaA (SRN)
- Sladový extrakt (pro mikrobiologii), Merck KGaA (SRN)
- Agar (granulovaný, čištěný, bez inhibitorů, pro mikrobiologii), Merck KGaA (SRN)

- Pepton (Pepton z pankreaticky štěpeného kaseinu, bez sulfonamidových antagonistů, pro mikrobiologii), Merck KGaA (SRN)
- Destilovaná voda

#### **4.2.3 Použité softwarové programy**

- FlexControl 3.0 (Ultraflex TOF/TOF), Bruker Daltonik GmbH (SRN)
- Maldi Biotyper 3.0 (Software for microorganism identification and classification), Bruker Daltonik GmbH (SRN)
- 2100 Expert Software, Agilent Technologies (USA)
- NIS-Elements F, Nikon Corporation (Japonsko)

## **4.3 Biotypizace MALDI-TOF**

### **4.3.1 Příprava kultivačních médií**

#### **4.3.1.1 Příprava YPD média (*Yeast pepton dextrose*)**

Na předvážkách bylo naváženo 5 g glukózy, 5 g peptonu, 5 g agaru a 2,5 g kvasničného extraktu, které byly umístěny do varné baňky s plochým dnem o objemu 1 000 ml. Odměrným válcem bylo do baňky přidáno 250 ml vody. Vzniklá směs byla důkladně promíchána a baňka byla opatřena zátkou z buničité vaty s hliníkovou fólií. Směs byla povařena ve vodní lázni přibližně 30-45 min, médium bylo nadávkováno do zkumavek a poté sterilováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 min. Sterilní YPD médium bylo ponecháno v šikmé poloze až do ztuhnutí. Ztuhlé médium bylo uskladněno v suchém a bezprašném prostředí při teplotě 4-6 °C.

#### **4.3.1.2 Příprava sladivého agaru**

Na předvážkách bylo odváženo 35 g sladivého extraktu, 1 g glukózy a 11 g agaru. Navážené suroviny byly kvantitativně převedeny do varné baňky s plochým dnem o objemu 1 000 ml. Odměrným válcem bylo do baňky přidáno 500 ml vody. Obsah baňky byl důkladně promíchán a hrdlo bylo opatřeno zátkou z buničité vaty s hliníkovou fólií. Vzniklá směs byla povařena ve vodní lázni po dobu 45 min, médium bylo nadávkováno do zkumavek a poté sterilováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 min. Sterilní sladivové médium bylo ponecháno v šikmé poloze až do ztuhnutí. Ztuhlé médium bylo uskladněno v suchém a bezprašném prostředí při teplotě 4-6 °C.

### **4.3.2 Inokulace kvasinek**

V laminárním boxu byly pomocí očkovací kličky přeočkovány kmeny kvasinek z původního šikmého sladivého média na připravený sladivý agar a YPD médium. Očkovací box byl nejprve vysterilován UV zářením po dobu 30 min. Očkovací klička byla vyžihána v plameni kahanu a z původní zkumavky byl odebrán vzorek kultury mikroorganismů, který byl jemnými krouživými pohyby aplikován na připravené médium, aniž by došlo k porušení celistvosti jeho povrchu. Po inokulaci byla zkumavka uzavřena zátkou z buničité vaty, která byla také sterilována v plameni kahanu. Tento postup inokulace byl použit pro oba dva typy kultivačních médií a celkem 84 kmenů kvasinek.

### **4.3.3 Kultivace kvasinek**

Veškeré kmeny kvasinek, naočkované na šikmém YPD médiu a sladivém agaru ve zkumavkách, byly kultivovány celkem 4 dny při teplotě 20 °C.

#### **4.3.4 Příprava matric pro MALDI-TOF MS**

##### ***4.3.4.1 Příprava matrice č. 1 (CHCA)***

Byl připraven 10% roztok kyseliny trifluoroctové v destilované vodě. Množství 10 mg kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicové bylo rozpuštěno ve směsi složené z 500  $\mu\text{l}$   $\geq 99,9\%$  acetonitrilu, 250  $\mu\text{l}$  10% kyseliny trifluoroctové a 250  $\mu\text{l}$  destilované vody. Připravená matrice byla uskladněna v chladničce.

##### ***4.3.4.2 Příprava matrice č. 2 (SAFA)***

Do dvou mikrozkušavek typu Eppendorf bylo na analytických váhách odváženo 10 mg kyseliny ferulové (FA) a 30 mg kyseliny sinapové (SA). Obě kyseliny byly rozpuštěny ve směsi složené z 500  $\mu\text{l}$   $\geq 99,9\%$  acetonitrilu, 250  $\mu\text{l}$  10% kyseliny trifluoroctové a 250  $\mu\text{l}$  destilované vody. Roztoky kyseliny sinapové a ferulové byly smíchány v poměru 1:1. Připravená matrice byla uskladněna v chladničce.

#### **4.3.5 Metody přípravy a aplikace vzorku na MALDI-TOF desku**

##### ***4.3.5.1 Metoda přípravy a aplikace vzorku dle firmy Bruker (Metoda č. 1, EtOH-CHCA)***

Do mikrozkušavek typu Eppendorf bylo nadávkováno 300  $\mu\text{l}$  destilované vody. V laminárním boxu byly inokulační kličkou odebrány vzorky kvasinek a umístěny do připravených mikrozkušavek. Suspenze kvasinek byla důkladně promíchána pomocí Vortex mixeru a ke každému vzorku bylo přidáno 900  $\mu\text{l}$  ethanolu. Vzorky se nechaly odstředit 10 min při 10 000 rpm. Vzniklý supernatant byl odebrán a k sedimentu bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  70% kyseliny mravenčí. Celá směs byla důkladně promíchána na Vortex mixeru. Jakmile bylo ke vzorkům přidáno 100  $\mu\text{l}$   $\geq 99,9\%$  acetonitrilu, byly spuštěny stopky a vzorky se nechaly stát po dobu 30 min. Po uplynutí této doby byly mikrozkušavky vloženy do centrifugy na dobu 10 min při otáčkách 10 000 rpm. Mikropipetou byl nanesen 1  $\mu\text{l}$  supernatantu každého vzorku na vyznačenou polohu na MALDI-TOF desce. Po zaschnutí při laboratorní teplotě byly jednotlivé vzorky překryty 1  $\mu\text{l}$  matrice č. 1 (CHCA) a opět se nechaly zaschnout při laboratorní teplotě.

##### ***4.3.5.2 Kombinovaná metoda přípravy a aplikace vzorku (Metoda č. 2, EtOH-SAFA)***

Metoda č. 2 byla provedena identickým způsobem jako Metoda č. 1, liší se však v použití matrice použité k překrytí vzorku na MALDI-TOF desce. V případě této metody byla použita matrice č. 2 (směs roztoků kyseliny sinapové a ferulové v poměru 1:1).

##### ***4.3.5.3 Metoda přípravy a aplikace vzorku vypracovaná pro rod *Cryptococcus* rostoucí na sladidě (Metoda č. 3, H<sub>2</sub>O-SAFA)***

Do mikrozkušavek typu Eppendorf bylo nadávkováno mikropipetou 1 000  $\mu\text{l}$  destilované vody. V laminárním boxu byly sterilní inokulační kličkou odebrány vzorky kmenů kvasinek, které byly umístěny do připravených mikrozkušavek. Vzorky se nechaly odstředit 10 min

při 10 000 rpm. Poté byl odebrán supernatant a k sedimentu byl přidán 1 000  $\mu$ l destilované vody. Tento postup purifikace vzorků byl opakován celkem sedmkrát. Po skončení promývání vzorku byl odpipetován supernatant a k sedimentu bylo přidáno 50  $\mu$ l matrice č. 2 (směs roztoků kyseliny sinapové a ferulové v poměru 1:1). Vzorky byly zvortexovány a nechaly se stát po dobu 30 min. Po uplynutí této doby byly vzorky umístěny do centrifugy na dobu 10 min a při otáčkách 10 000 rpm. Mikropipetou byl nanesen 1  $\mu$ l supernatantu každého vzorku na přesně danou pozici na MALDI-TOF desce. Vzorky se nechaly zaschnout při laboratorní teplotě.

#### **4.3.6 Analýza proteinů MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií**

K analýze celkem 84 kmenů kvasinek rostoucích na dvou různých médiích byl použit hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme a MALDI-TOF deska MTP 384 Target Plate Polished Steel TF (Bruker Daltonik GmbH).

##### **4.3.6.1 Kalibrace**

Jako standard pro kalibraci zařízení byl zvolen cytochrom c, jehož 1  $\mu$ l byl nanesen na MALDI-TOF desku a po zaschnutí překryt 1  $\mu$ l matrice č. 2 (směs roztoků kyseliny sinapové a ferulové).

##### **4.3.6.2 Měření na zařízení MALDI TOF/TOF**

Připravená MALDI-TOF deska se vzorky byla umístěna na „nosič desky“ a poté vložena do hmotnostního spektrometru. Měření proběhlo prostřednictvím programu *Flexcontrol – Ultraflex TOF/TOF* v lineárně pozitivním módu (LP MID). Před zahájením měření byla provedena kalibrace zařízení a také byly nastaveny veškeré parametry analýzy (intenzita laseru atd.). Kurzorem byla zvolena pozice vzorku na desce. Místo nástřelu laseru bylo náhodně vybráno samotným softwarem. V případě, že získané spektrum nebylo vyhovující, byla upravena intenzita laseru a „nástřel“ byl opakován.

## 4.4 Sekvence D1/D2 oblasti 26S rRNA genu

### 4.4.1 Seznam kmenů navržených na sekvenaci

Tab. 10 Seznam kmenů kvasinek navržených na sekvenaci domény D1/D2 26S rRNA.

Číslo CCY	Druh
021-004-105	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
021-004-123	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
021-013-005	<i>Saccharomyces bayanus</i>
021-022-008	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
025-006-031	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
026-009-022	<i>Debaryomyces hansenii</i>
029-002-015	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
029-002-024	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
029-002-121	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
029-002-135	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
029-002-144	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
029-008-010	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (sekvenovaný-CBS databáze)
039-004-006	<i>Pichia fermentans</i>
039-023-003	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
000-048-035	<i>Saccharomyces pastorianus</i>

### 4.4.2 Izolace DNA

K izolaci DNA byl použit izolační kit *UltraClean® Microbial Isolation Kit* od firmy MO-BIO Laboratories. Do zkumavek *Microbead Tubes* bylo v laminárním boxu napipetováno 300 µl lyzačního tlumivého roztoku *Microbead Solution*. Pomocí sterilní očkovací kličky bylo přidáno dostatečné množství kvasinkové kultury, které bylo navíc pečlivě rozsuspendováno v roztoku.

Ke směsi ve zkumavce bylo napipetováno 50 µl roztoku MD1 a mikrozkušavky byly v horizontální poloze vloženy do vortex mixeru na dobu 10 min při maximální rychlosti. Po promíchání byly mikrozkušavky umístěny do centrifugy (1 min, 11 100 rpm). Supernatant o objemu 320 µl byl napipetován do čisté 2 ml mikrozkušavky a k tomuto supernatantu bylo následně přidáno 100 µl roztoku MD2. Vzniklá směs byla promíchána pomocí vortex mixeru po dobu 5 s a poté inkubována ve vychlazeném stojanu po dobu 5 min a při teplotě 4 °C.

Po skončení inkubace byly zkumavky přemístěny do centrifugy (1,5 min, 11 100 rpm). Opět byl supernatant o objemu 450 µl napipetován do čisté 2 ml mikrozkušavky a k němu bylo přidáno 900 µl předem protřepaného roztoku MD3. Vzniklá směs byla promíchána pomocí vortex mixeru po dobu 5 s a 700 µl této směsi bylo napipetováno do mikrozkušavky s kolonkou a umístěno do centrifugy (1 min, 11 1000 rpm).

Získaný přefiltrovaný roztok byl odstraněn do odpadové kádinky a zbytek roztoku (supernatant + 900 µl MD3) byl opět napipetován na kolonku ve zkumavce, které byly poté vloženy do centrifugy (1 min, 11 100 rpm). Přefiltrovaný roztok byl znovu odstraněn a na kolonku bylo přidáno 300 µl roztoku MD4. Zkušavky byly umístěny do centrifugy,

vzniklý přefiltrovaný roztok byl odstraněn a opět byly zkumavky vloženy do centrifugy na 1 min a při 11 100 rpm. Kolonka byla přenesena do čisté mikrozukavky a na membránu uvnitř kolonky bylo napipetováno 50 µl roztoku MD5. Po centrifugaci (1 min, 11 100 rpm) byla kolonka odstraněna a v mikrozukavkách byl připraven roztok DNA pro PCR, který byl uchován při teplotě -20 °C.

#### 4.4.3 Polymerázová řetězová reakce

Veškeré potřebné chemikálie – sterilní destilovaná voda, Taq polymerázový pufr A, dNTPs a primery NL1 a NL4 byly nejprve při laboratorní teplotě rozmrazeny a poté byla připravena směs *Master Mix* pro 18 vzorků a 2 případné rezervy. Pro amplifikaci D1/D2 oblasti 26S rRNA genu byly použity specifické primery NL 1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') a NL 4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3').

V laminárním boxu byly do 2 ml mikrozukavky napipetovány jednotlivé složky směsi v pořadí, které znázorňuje **Tab. 11**. Celkový objem směsi byl 976 µl.

**Tab. 11** Složení směsi *Master Mix*.

<b>Komponenty směsi <i>Master Mix</i></b>	<b>Objem</b>
Sterilní destilovaná voda	776 µl
Taq polymerázový pufr A	100 µl
dNTPs	20 µl
primer NL 1 (10 µmol/l)	40 µl
primer NL 4 (10 µmol/l)	40 µl

Vzniklá směs ve zkumavce byla promíchána a 48,8 µl směsi bylo napipetováno do 0,2 ml mikrozukavek pro vzorky. Do každé zkumavky byl poté přidán 1 µl vyizolované templátové DNA a 0,2 µl Taq DNA polymerázy. Připravené vzorky ve zkumavkách byly promíchány pomocí vortex mixeru a centrifugovány po dobu 30 s a při 2 500 rpm.

Zkumavky byly vloženy do termocykleru SureCycler 8800 (Agilent Technologies). V nastavení byl vybrán program „sekven1.pcr“ (čas 1:48:35) a zvolen objem PCR směsi – 50 µl. Teplotní a časový profil reakce obsahuje **Tab. 12**. Získané PCR produkty byly skladovány při -20 °C.

**Tab. 12** Teplotní a časový profil PCR reakce.

Jednotlivé kroky PCR	Teplota [°C]	Čas [min]	
Počáteční denaturace	94	3	
Denaturace	94	0,5	
30 cyklů	Anelace	52	0,5
	Polymerizace	72	1
Konečná polymerizace	72	10	

#### 4.4.4 Purifikace PCR produktů

Pro přečištění získaných PCR produktů byl použit purifikační kit *StrataPrep PCR Purification Kit* od firmy Agilent Technologies.

K celému objemu PCR produktu (50 µl) bylo přidáno 50 µl roztoku *DNA Binding Solution* a vzniklá směs byla „špičkou“ promíchána. Do mikrozkušavek s kolonkou bylo napipetováno 50 µl této směsi, která byla zcentrifugována (1 min, 12 200 rpm). Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a na kolonku bylo napipetováno zbylých 50 µl směsi. Po opětovném odstředění byl přefiltrovaný roztok znovu odstraněn a na kolonku bylo napipetováno 730 µl promývacího roztoku *Wash Buffer*. Opět byly zkumavky s kolonkou vloženy do centrifugy (1 min, 12 200 rpm), přefiltrovaný roztok byl odstraněn a znovu zcentrifugován. Kolonka byla následně přenesena do čisté mikrozkušavky a na membránu uvnitř kolonky bylo napipetováno 50 µl sterilní destilované vody.

Po 5 min inkubaci při laboratorní teplotě byly zkumavky vloženy do centrifugy (1 min, 12 200 rpm). Kolonka byla poté odstraněna a přečištěný PCR produkt v mikrozkušavce byl připraven pro následující analýzu.

#### 4.4.5 Analýza PCR produktů pomocí bioanalyzátoru

PCR produkty byly analyzovány automatickou kapilární elektroforézou s použitím Agilent 2100 Bioanalyzér (Agilent Technologies) a Agilent DNA 7500 LabChip kitu.

Nejprve byla připravena směs gel-barvivo (*gel-dye mix*): 25 µl roztoku *DNA dye concentrate* bylo napipetováno do vialky s označením *DNA gel matrix*. Roztok byl promíchán na vortex mixeru a odstředěn po dobu 30 s a 2 500 rpm. Celý objem roztoku byl přenesen do mikrozkušavky s kolonkou a znovu zcentrifugován po dobu 10-15 min při 2 100 rpm. Správná funkčnost gelu pro analýzu je 4 až 5 týdnů.

Do jamky na DNA čipu (**Obr. 31**), označené bílým písmenem G, bylo nadávkováno pomocí primovací stanice (**Obr. 31**) 9 µl směsi gel-barvivo. Stisknutím klapky stříkačky primovací stanice byla směs „natlačena“ do mikrokanálek. Identickým postupem byla směs aplikována do dalších dvou jamek označených „G“ černým písmem. Jamky pro vzorky (označení 1-12) a standard (*ladder*) byly poté naplněny 5 µl markeru. Do jamek s označením 1-12 byl nakonec napipetován 1 µl vzorku a do jamky pro standard byl nadávkován 1 µl roztoku standardu.

Připravený čip se vzorky byl protřepán na MS3 vortex mixeru po dobu 1 minuty a při 2 400 rpm. Před samotnou analýzou byl do bioanalyzátoru na dobu 10 s vložen čip určený

pro čištění elektrod, který byl naplněn 350  $\mu$ l sterilní destilované vody. Po přečištění elektrod byl do analyzátoru umístěn připravený čip se vzorky. V PC byl spuštěn *2100 Expert software* a navolen program *Instrument 2*, resp. DE04105503. Po skončení analýzy byly elektrody opět přečištěny destilovanou vodou.



**Obr. 31** DNA Chip (vlevo) a primovací stanice (vpravo) Agilent Technologies.

#### 4.4.6 Příprava přečištěných PCR produktů na sekvenaci

Před samotnou sekvenací PCR produktů bylo nezbytné naředit DNA v mikrozkušavce na koncentraci 10-20 ng/ $\mu$ l. Nařaděné vzorky se napipetovaly do 0,5 ml mikrozkušavek a výsledný objem vzorku byl upraven na hodnotu 20  $\mu$ l pomocí sterilní destilované vody.

#### 4.4.7 Sekvence domény D1/D2 oblasti 26S rRNA

Vybrané kmeny kvasinek, uvedené v **Tab. 10**, byly podrobeny sekvenční analýze domény D1/D2 oblasti 26 rRNA genu, která byla provedena pracovníky Biotechnologického centra, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Komenského v Bratislavě.

Výsledky sekvenční analýzy byly porovnány s dostupnými sekvencemi v databázích *Mycobank Database* (IMA) a *BLAST<sup>®</sup>: Basic Local Alignment Search Tool* (NCBI).

## 4.5 Stanovení vybraných charakteristik kvasinek

### 4.5.1 Seznam testovaných kmenů kvasinek

Pro stanovení veškerých vybraných charakteristik kvasinek – kvašení, přítomnost ureázy, konstanta radiálního růstu, mikroskopické pozorování a vzhled kolonií v tekutém médiu, bylo použito celkem dvacet kmenů kvasinek, které jsou uvedeny v **Tab. 13**.

**Tab. 13** Seznam kmenů kvasinek pro stanovení vybraných charakteristik.

Číslo CCY	Druh
021-004-109	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S)
021-004-129	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
021-013-005	<i>Saccharomyces bayanus</i>
021-022-008	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
025-006-031	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
029-001-021	<i>Metschnikowia reukaufii</i>
029-002-121	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
029-008-008	<i>Kluyveromyces lactis</i> (S)
029-009-028	<i>Pichia kudriavzevii</i> (S)
029-038-075	<i>Pichia jadinii</i>
035-006-005	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
038-001-035	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (S)
039-004-006	<i>Pichia fermentans</i>
039-023-012	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (S)
039-031-004	<i>Pichia kluyveri</i>
041-006-021	<i>Debaryomyces hansenii</i> (S)
046-001-002	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
048-035-000	<i>Saccharomyces pastorianus</i>
050-002-002	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
051-001-001	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (S)

### 4.5.2 Kvašení

#### 4.5.2.1 Příprava živných médií

Pro přípravu glukózového média bylo do kádinky o objemu 600 ml naváženo na předvážkách 10 g glukózy a 0,5 g extraktu z kvasnic. Odměrným válcem bylo přidáno 500 ml vody a vzniklá směs byla důkladně promíchána. Médium bylo ihned rozléváno do zkumavek. Do každé zkumavky byla navíc umístěna tzv. *Durhamova plynová zkumavka* tak, aby byla kompletně ponořená a naplněná médiem bez přítomnosti bublin. Takto připravené zkumavky byly opatřeny zátkou z buničité vaty a umístěny do malého autoklávu, kde byly sterilovány 60 min při teplotě 121 °C a tlaku 120 kPa. Postup i navážky jednotlivých sacharidů pro přípravu dalších médií s obsahem maltózy, sacharózy, laktózy, galaktózy a rafinózy byly identické jako v případě glukózového média.

#### **4.5.2.2 Inokulace kvasinek**

V laminárním boxu byla 1× sterilní očkovací kličkou (10 µl) odebrána kultura ze šikmého sladinného agaru do zkumavek s připravenými sacharidovými médii. Zkumavky byly poté uskladněny při teplotě 20 °C.

#### **4.5.2.3 Sledování průběhu kvašení**

Průběh kvašení na jednotlivých sacharidových substrátech byl sledován každý den po dobu 2 týdnů. Bylo pozorováno několik zásadních parametrů:

- tvorba bublinek (případně prstence na hladině média)
- plnění Durhamovy plynové zkumavky vznikajícím oxidem uhličitým a její pohyb směrem k hladině média
- intenzita kvašení (málo intenzivní, intenzivní, bouřlivé)
- zákal ve zkumavce

Na základě těchto hledisek bylo do tabulek zaznamenáno, zda kvašení proběhlo – označení (+) či nikoliv – označení (–).

#### **4.5.3 Stanovení přítomnosti ureázy**

##### **4.5.3.1 Příprava média**

Do varné baňky s 500 ml studené vody bylo odváženo 10 g močoviny, 4,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 4,8 g hydrogenfosforečnanu sodného a 0,5 g extraktu z kvasnic. Na analytických vahách bylo naváženo 0,005 g fenolové červeně, která byla také přidána do varné baňky. Výsledná směs se nesmí sterilovat klasickým způsobem (v autoklávu) za vysoké teploty, ale v hermeticky uzavřené nádobě za podtlaku a pomocí proudu vody po dobu 5 min. Sterilní médium bylo v laminárním boxu rozléváno do zkumavek.

##### **4.5.3.2 Inokulace kvasinek**

V laminárním boxu byla 1x sterilní očkovací kličkou (10 µl) odebrána kultura ze šikmého sladinného agaru do zkumavek s připraveným médiem. Zaočkované zkumavky byly uskladněny při teplotě 20 °C.

Barva média byla pozorována každý den po dobu 14 dní.

#### **4.5.4 Stanovení konstanty radiálního růstu**

##### **4.5.4.1 Příprava agarových ploten**

Pro přípravu agarových ploten byl předem připravený ztuhlý sladinný agar ve varné baňce umístěn do vroucí vodní lázně a povařen přibližně po dobu 30 min. Během této doby byl obsah baňky pravidelně promícháván. Po uplynutí 30 min byl agar v laminárním boxu rozléván na připravené Petriho misky. Ztuhlé agarové plotny byly skladovány při teplotě 20 °C.

#### **4.5.4.2 Inokulace kvasinek**

Dvacet vybraných kmenů kvasinek, rostoucích na šikmém sladínovém agaru, bylo přeočkováno na sladínový agar na Petriho miskách. Očkovací kličkou, vyžíhanou v plameni kahanu, byla sterilně odebrána kultura každého kmene kvasinek. Vzorky kultur byly umístěny do zkumavek se sterilní vodou tak, aby byl na hladině vody patrný zákal. Ihned poté bylo odpipetováno množství kultury ve vodě, které bylo umístěno na sladínový agar ve formě jedné kapky. Připravené Petriho misky s kulturou se nechaly zaschnout po dobu 20-30 min při 20 °C.

#### **4.5.4.3 Kultivace kvasinek**

Všech dvacet vybraných kmenů kvasinek, naočkovaných na sladínovém agaru v Petriho miskách, bylo kultivováno po dobu 21 dní při teplotě 20 °C. Růst kolonií byl po celou dobu kultivace pravidelně sledován.

### **4.5.5 Příprava mikroskopických preparátů a pozorování buněk**

#### **4.5.5.1 Inokulace kvasinek**

Dvacet vybraných kmenů kvasinek bylo přeočkováno z původního šikmého sladínového agaru do zkumavek s tekutým sladínovým médiem. Sterilní očkovací kličkou bylo odebráno množství kultury ze šikmého agaru a přeneseno do zkumavky s tekutým médiem.

#### **4.5.5.2 Kultivace v tekutém médiu**

Vybrané kmeny kvasinek, které byly přeočkovány do zkumavek s tekutým sladínovým médiem, byly kultivovány při teplotě 20 °C po dobu 4 dní. Po skončení kultivace byly odebrány vzorky kultur pro přípravu mikroskopických preparátů a pozorování buněk kvasinek.

#### **4.5.5.3 Posouzení růstu kvasinek v tekutém médiu**

U všech dvaceti vybraných kmenů byl popsán vzhled kultury a růst v tekutém sladínovém médiu. Byla sledována přítomnost charakteristických znaků, jako jsou zákal, usazenina, prstenec nebo hrubá kožka.

#### **4.5.5.4 Mikroskopické pozorování**

Zvolené kmeny kvasinek, rostoucí v tekutém sladínovém médiu, byly použity pro přípravu mikroskopických preparátů. Sterilní podložní sklíčko, původně uložené v ethanolu, bylo opáleno v plameni kahanu. Pipetou byla na podložní sklíčko nanesena kapka sterilní vody. Očkovací kličkou byla odebrána kultura, která byla ihned umístěna do kapky vody a překryta krycím sklíčkem. Připravené preparáty byly pozorovány pomocí mikroskopu s objektivem se zvětšením 60× a programu NIS-Elements F.

Veškeré pořízené fotografie buněk, kultury v tekutém sladínovém médiu a kolonií na sladínovém agaru v Petriho miskách byly použity pro všeobecnou charakteristiku a popis jednotlivých druhů v rámci teoretické části této práce.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Biotypizace MALDI-TOF

Všech 84 izolátů kvasinek bylo nejprve předběžně identifikováno konvenčními mikrobiologickými metodami. Celkem 18 kmenů z 84 bylo předem sekvenováno a jejich taxonomické zařazení tak bylo ověřeno. Na základě výsledků byly ostatní izolované kmeny zařazeny do skupin na úrovni druhu (**Tab. 3**). Některé kmeny je však natolik obtížné rozlišit, že běžné mikrobiologické metody k tomuto účelu nestačí. Proto byla pro identifikaci kmenů kvasinek zvolena metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

Identifikace kmenů byla provedena vzájemným porovnáním hmotnostních spekter sekvenovaných kmenů s kmeny, jejichž taxonomické zařazení bylo zatím pouze navrženo. Na základě získaných hodnot skóre a posouzení dendrogramů byly kmeny zařazeny do celkem 18 fylogenetických skupin.

MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií bylo jednoznačně identifikováno 51 kmenů kvasinek na úrovni druhu. Pro celkem 6 kmenů kvasinek byla biotypizace opakována díky nejednoznačnosti výsledků. Dohromady 15 kmenů nebylo možné touto metodou spolehlivě rozlišit nebo správně identifikovat, a proto byly navrženy na sekvenaci domény D1/D2 26S rRNA.

#### 5.1.1 Volba kultivačního média a metody přípravy a aplikace vzorku

Z hlediska *volby kultivačního média* pro úspěšnou biotypizaci byla sledována a manuálně posouzena kvalita spekter kmenů kultivovaných na sladínovém agaru a YPD médiu.

Sladínový agar se oproti YPD médiu používá ve Sbírce kultur kvasinek (CCY) jako standardní kultivační médium pro uchování kmenů kvasinek. Avšak složení tohoto agaru není natolik komplexní jako v případě YPD média, a proto na YPD médiu byl růst kvasinek podstatně intenzivnější. Při srovnání kultur rostoucích na sladíně a na YPD ve zkumavkách byl jasně viditelný rozdíl ve výšce profilu, konzistenci i hustotě narostlé kultury. A právě to, že YPD zajišťuje nutričně bohatší a vhodnější podmínky pro růst buněk, je důvodem, proč je toto médium vhodné pro biotypizaci kvasinek metodou MALDI-TOF.

Následující tabulka (**Tab. 14**) zobrazuje počet veškerých vyhovujících a nevyhovujících hmotnostních spekter pro vyhodnocení a také tzv. 3. *kategorii spekter*.

**Tab. 14** Kvalita hmotnostních spekter v rámci kultivačních médií a metod přípravy a aplikace vzorku (celkový počet spekter pro jedno médium a metodu je 90).

Kultivační médium	Metoda přípravy a aplikace vzorku								
	1. EtOH CHCA			2. EtOH-SAFA			3. H <sub>2</sub> O-SAFA		
YPD	60	20	10	80	10	0	70	19	1
Sladínový agar	38	32	20	55	28	7	63	21	6

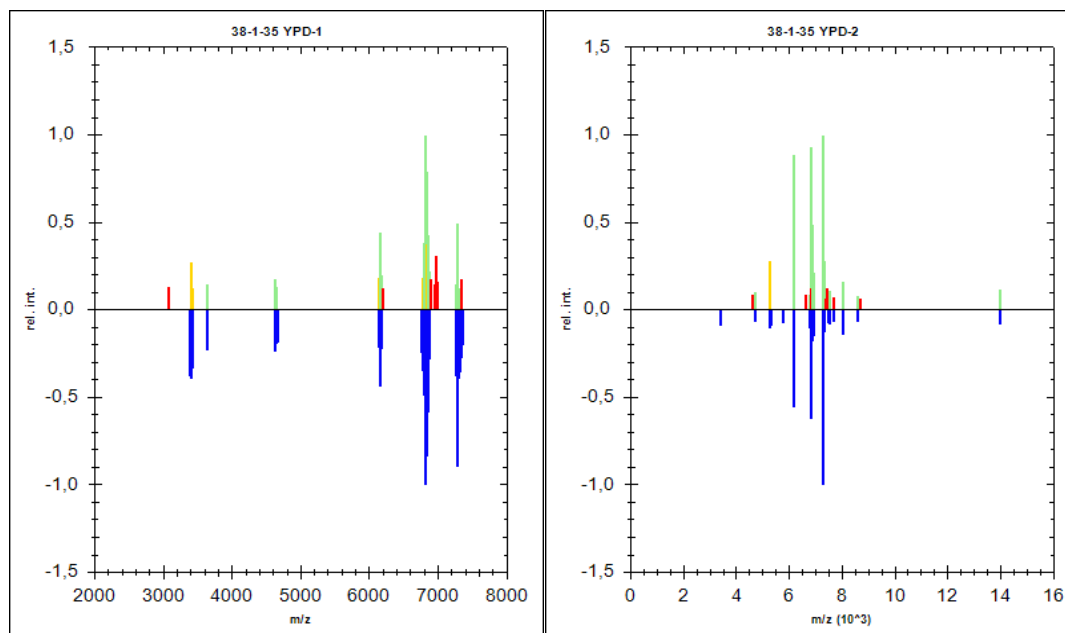
Pozn.: zelená barva – vyhovující spektra; oranžová barva – spektra 3. kategorie; červená barva – nevyhovující spektra

**Příprava a aplikace vzorku** je klíčovým krokem biotypizace MALDI-TOF. Volba správného postupu, rozpouštědel a matrice hraje zásadní roli ve vzhledu hmotnostních spekter. Opět byla manuálně posouzena kvalita spekter z hlediska přípravy a aplikace vzorku.

Standardní metoda č. 1 (CHCA), sestavená výrobcem Bruker Daltonik GmbH, doporučuje k narušení buněčné stěny buněk ethanol a kyselinu mravenčí. K nanesení vzorku a matrice se využívá metody *dried-droplet*, tedy aplikace 2 vrstev – vzorku a matrice zvlášť, přičemž jako matrice se volí kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxysořicová. Tento typ matrice je nazýván „zlatým standardem“ pro identifikaci intaktních proteinů až do 12 kDa. Zvolený postup přípravy vzorku dle výrobce je vyhovující, avšak použitá matrice nikoliv a díky tomu metoda č. 1 dosáhla nejnižší úspěšnosti z hlediska kvality hmotnostních spekter na obou kultivačních médiích (**Obr. 32**).

Naproti tomu identický postup přípravy vzorku, ale za použití jiné matrice – směs kyseliny sinapové a ferulové v poměru 1:1 (SAFA), byl podstatně úspěšnější. Kyselina sinapová je dle výrobce Bruker Daltonik GmbH vhodná pro analýzu proteinů o vyšší molekulové hmotnosti (10-150 kDa), avšak v případě malých peptidů (do 3 kDa) nemusí produkovat dostatečný signál, a proto se naopak doporučuje matrice CHCA. Druhá složka směsi – kyselina ferulová poskytuje odezvu i u proteinů s molekulovou hmotností nižší než 5 kDa. Smícháním kyseliny sinapové a ferulové tak vznikne „kombinovaná matrice“, díky níž lze analyzovat a identifikovat proteiny v širokém rozsahu molekulových hmotností a navíc s vysokou úspěšností.

Na **Obr. 32** je patrný viditelný rozdíl v rozsahu  $m/z$  analyzovaných proteinů při použití matrice CHCA (3 000-8 000  $m/z$ ) a matrice SAFA (2 000-15 000  $m/z$ ) na YPD médiu.



**Obr. 32** Hmotnostní spektra kmene CCY 38-1-35 (směrem dolů) a CCY 38-3-1-37 (směrem nahoru) na YPD médiu, metoda přípravy a aplikace vzorku č. 1 (obrázek vlevo) a č. 2 (obrázek vpravo).

Na YPD médiu za použití SAFA matrice bylo získáno nejvíce vyhovujících spekter ze všech metod přípravy vzorku, zároveň ani jedno ze spekter nespadlo do kategorie nevyhovujících. Celkem 10 z 90 spekter bylo zařazeno do 3. kategorie.

V případě sladinového agaru byla kvalita hmotnostních spekter výrazně nižší. Celkem 7 z 90 spekter bylo označeno jako nevyhovující. Nejvyššího rozdílu oproti YPD médiu bylo dosaženo v kategorii vyhovujících spekter, do které v případě sladinu spadá pouze 55 spekter z 90. Lze tedy konstatovat, že kombinací matrice SAFA a kultivačního média YPD je možné dosáhnout až 100% úspěšnosti identifikace kmenů askomycetních kvasinek na úrovni druhu.

Kombinovaná matrice SAFA byla použita i v rámci metody č. 3 (sedminásobné promývání destilovanou vodou), kde byla součástí směsi matrice-vzorek. Z **Tab. 14** je patrné, že na YPD médiu bylo získáno pouze jedno nevyhovující hmotnostní spektrum, ale počet spekter v 3. kategorii byl vyšší než na stejném médiu u metody č. 2. Naopak na sladinovém agaru bylo touto metodou získáno nejvíce vyhovujících spekter a nejméně nevyhovujících.

## 5.1.2 Taxonomické zařazení kmenů kvasinek na úrovni druhu

### 5.1.2.1 Rod *Debaryomyces*

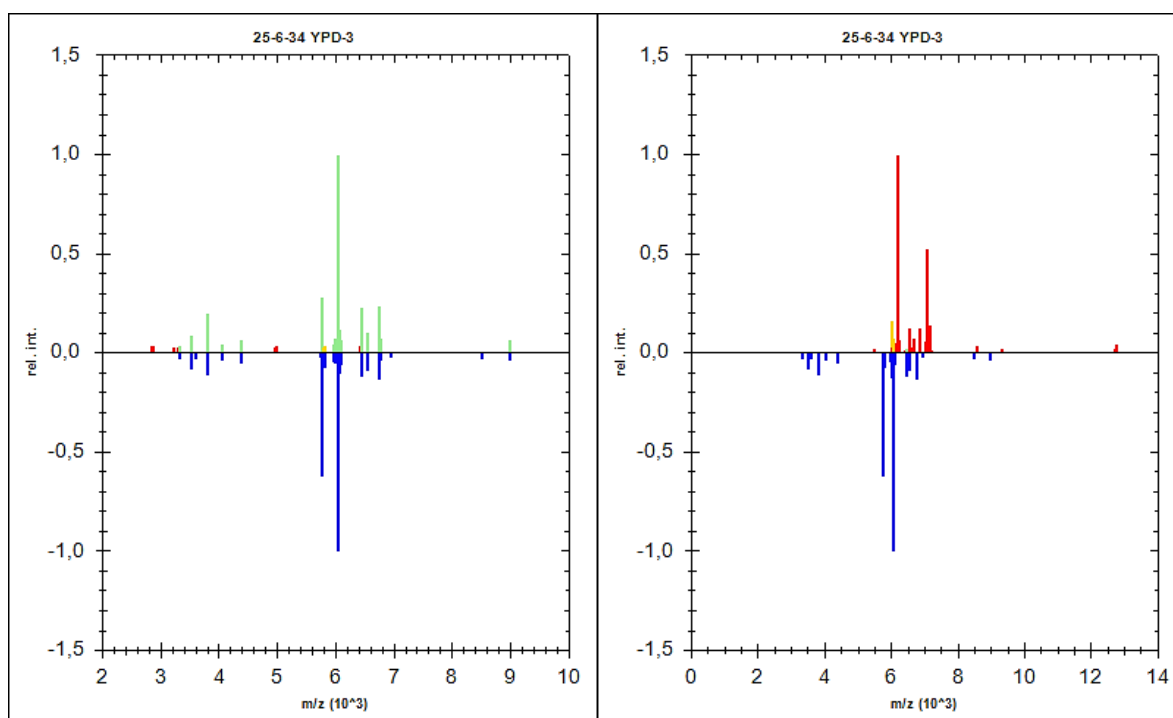
Na základě konvenčních mikrobiologických metod byly do fylogenetické skupiny *Debaryomyces hansenii* zahrnuty kmeny CCY 46-6-21, CCY 41-6-25 a CCY 26-9-22. Jediným potvrzeným zástupcem této skupiny je sekvenovaný kmen CCY 41-6-21. Kmen CCY 41-6-25 vykazoval pouze na YPD médiu (metoda č. 3) hodnotu vyšší než 2,000, v ostatních případech byly hodnoty nižší než 1,500. Tento kmen byl označen jako zástupce rodu *Debaryomyces*, ale nikoliv druhu *D. hansenii*, ale *D. fabryi*. U kmene CCY 26-9-22 bylo na sladinovém agaru u všech metod přípravy a aplikace vzorku dosaženo nulové hodnoty skóre. Na YPD médiu nebyla překročena hodnota skóre 0,376. Na základě těchto výsledků bylo rozhodnuto, že kmen CCY 26-9-22 nepatří do fylogenetické skupiny *D. hansenii* a byl navržen na sekvenování domény D1/D2 26S rRNA.

### 5.1.2.2 Rod *Hanseniaspora*

Fylogenetická skupina *Hanseniaspora uvarum* na základě prvotních výsledků obsahovala tři kmeny, přičemž kmen CCY 25-6-34 byl podroben sekvenování a je potvrzeným zástupcem této skupiny.

Porovnáním sekvenovaného kmene s kmenem CCY 25-6-26 bylo zjištěno, že tento kmen je se stoprocentní úspěšností zástupcem druhu *Hanseniaspora*, protože ve všech případech vykazoval hodnoty skóre vyšší než 2,000, například u metody č. 3 na YPD médiu bylo dosaženo skóre 2,629 (**Obr. 33**). Kromě kmene CCY 25-6-26 byly do této skupiny zařazeny i další kmeny – CCY 46-1-2, CCY 46-1-7, CCY 25-6-28 a CCY 25-6-36, jejichž taxonomické zařazení bylo opět potvrzeno vysokými hodnotami skóre.

Naopak v případě kmene CCY 25-6-31 byla většina hodnot skóre nižší než 1,700 (**Obr. 33**). Přestože na sladinovém agaru u metody č. 2 byla hodnota skóre 1,810 a v případě metody č. 3 dokonce 2,451, nebyl tento kmen označen jako jednoznačný zástupce skupiny, a proto byl navržen na sekvenování.



**Obr. 33** Hmotnostní spektrum kmene CCY 25-6-26 (YPD-3; obr. vlevo, směrem nahoru) a CCY 25-6-34 (YPD-3; obr. vlevo, směrem dolů), hodnota skóre: 2,629; hmotnostní spektrum kmene CCY 25-6-31 (YPD-3; obr. vpravo, směrem nahoru) a CCY 25-6-34 (YPD-3; obr. vpravo, směrem dolů), hodnota skóre: 0,000.

Jako zástupci fylogenetické skupiny *Hanseniaspora guilliermondii* byly na základě mikrobiologických metod označeny celkem tři kmeny, přičemž kmen CCY 46-1-3 je díky sekvenování potvrzený zástupce tohoto rodu.

Podle výsledků porovnání sekvenovaného kmene s kmenem CCY 46-1-5, které ve většině případů dosáhly hodnot vyšších než 2,000, byl kmen CCY 46-1-5 zařazen do skupiny *H. guilliermondii*.

Naproti tomu hodnoty skóre při porovnání sekvenovaného kmene s kmenem CCY 46-1-2 nebyly ani v jednom případě vyšší než 2,000 a pouze třikrát bylo dosaženo hodnot v intervalu 1,700-1,999. Vzhledem k takto nejednoznačným výsledkům byl kmen CCY 46-1-2 porovnán také se sekvenovaným kmenem *H. uvarum* (CCY 25-6-34). Výsledky vzájemného porovnání, které znázorňuje **Tab. 15**, prokázaly, že kmen CCY 46-1-2 je zástupce druhu *H. uvarum* a nikoliv *H. guilliermondii*.

**Tab. 15** Hodnoty skóre porovnání sekvenovaného kmene CCY 25-6-34 a kmene CCY 46-1-2.

Kmeny	Metoda a kultivační médium					
	1 YPD	1 SA	2 YPD	2 SA	3 YPD	3 SA
25-6-34 (S) a 46-1-2						
<b>Skóre</b>	2,531	2,471	2,714	2,398	2,300	2,703

### 5.1.2.3 Rod *Kluyveromyces*

Mezi zástupce fylogenetické skupiny *Kluyveromyces lactis* byl zařazen sekvenovaný kmen *K. lactis* CCY 29-8-8 a nesequenované kmeny CCY 50-2-2, CCY 43-11-1. Vzhledem k vysokým hodnotám skóre s těmito kmeny byl do této skupiny přeražen také kmen

CCY 51-1-1, který byl původně identifikován jako *K. marxianus*. Správnost přerazení kmene CCY 51-1-1 navíc potvrzuje nízká hodnota skóre (0,929) při srovnání se sekvenovaným *K. marxianus* CCY 29-8-10.

#### 5.1.2.4 Rod *Metschnikowia*

Nejrozsáhlejší fylogenetickou skupinu – *Metschnikowia pulcherrima* tvořilo původně 24 kmenů, ze kterých byl pouze kmen CCY 29-2-143 sekvenován.

Celkem 16 kmenů bylo identifikováno jako zástupce druhu *M. pulcherrima* a jejich prvotní taxonomické zařazení bylo tudíž potvrzeno.

U šesti kmenů byly výsledky nejednoznačné a pro sekvenaci byly z této skupiny navrženy čtyři kmene – CCY 29-1-15, CCY 29-2-24, CCY 29-3-121 a CCY 29-2-135.

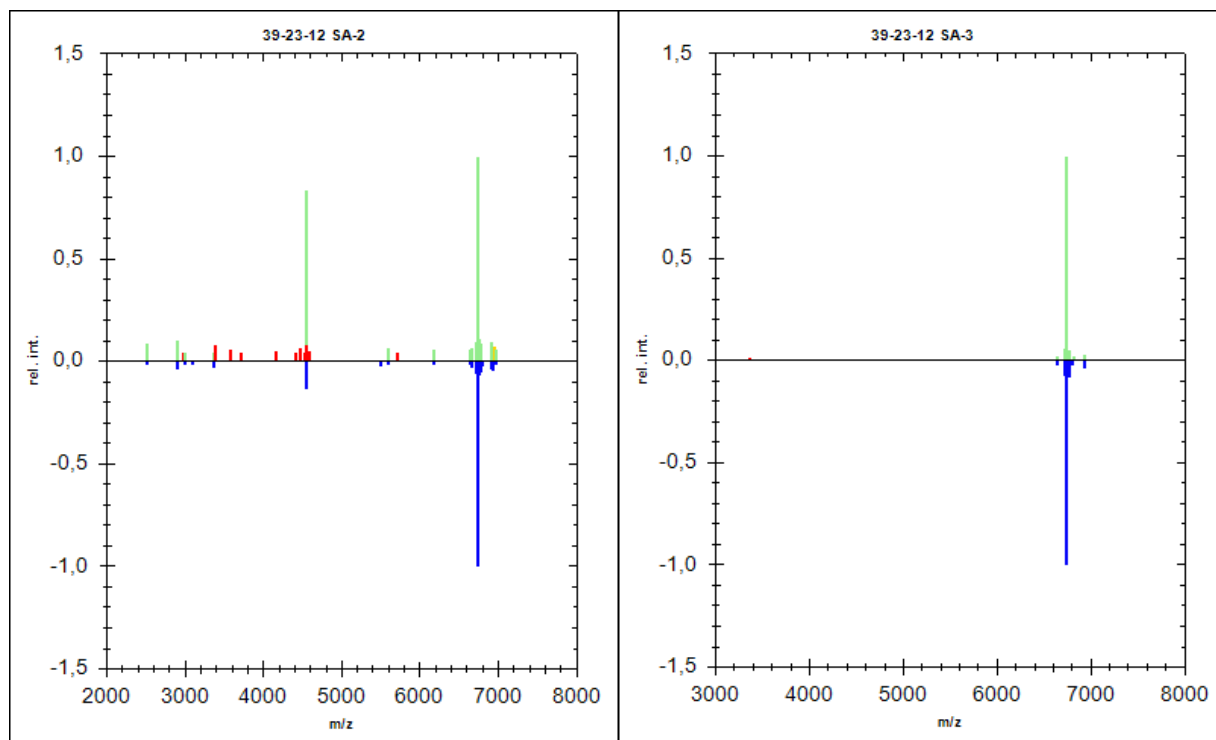
Dva kmene CCY 29-2-14 a CCY 29-2-135 nevykazovaly téměř žádnou podobnost se sekvenovaným kmenem. Nicméně porovnáním CCY 29-2-14 s CCY 29-1-22, což je sekvenovaný kmen druhu *Metschnikowia reukaufii*, bylo zjištěno, že CCY 29-2-14 je zástupcem druhu *M. reukaufii* a nikoliv *M. pulcherrima*. Druhý uvedený kmen CCY 29-2-135 vykazoval minimální podobnost s CCY 29-2-14, a proto byl navržen na sekvenaci domény D1/D2 26S rRNA.

Druhou fylogenetickou skupinou tohoto rodu je *Metschnikowia reukaufii*, která obsahuje sekvenovaný kmen CCY 29-1-22, dále také kmene CCY 29-1-21, CCY 29-1-17 a CCY 29-2-14. Kmen CCY 29-2-14 byl původně označen jako zástupce druhu *M. pulcherrima*, ale díky velmi nízké podobnosti se sekvenovaným kmenem CCY 29-2-143 (*M. pulcherrima*) byl z této skupiny vyřazen a porovnán se sekvenovaným kmenem CCY 29-1-22. V tomto případě byla podobnost velmi vysoká, a tak byl kmen přeřazen do fylogenetické skupiny *M. reukaufii*.

#### 5.1.2.5 Rod *Meyerozyma*

Fylogenetická skupina *Meyerozyma guilliermondii* obsahuje sekvenovaný kmen CCY 39-23-12 a kmen CCY 39-23-5, které při vzájemném porovnání vykazovaly vysokou podobnost. Tuto skutečnost potvrzují hodnoty skóre, které byly u všech porovnání vyšší než 2,000. Na sladidlovém agaru u metody č. 2 byla hodnota skóre 2,663 a na stejném agaru v rámci metody č. 3 dokonce 2,942, což je vůbec nejvyšší hodnota skóre, které bylo dosaženo v rámci kompletní biotypizace (**Obr. 34**).

Původně byl mezi zástupce druhu *M. guilliermondii* zařazen také kmen CCY 39-23-3, ale vzhledem k nejasným výsledkům byl tento kmen navržen na sekvenování.



**Obr. 34** Hmotnostní spektrum kmene CCY 39-23-12 (SA-2; obr. vlevo, směrem dolů) a kmene CCY 39-23-5 (SA-2; obr. vlevo, směrem nahoru), hodnota skóre: 2,663; hmotnostní spektrum kmene CCY 39-23-12 (SA-3, obr. vpravo, směrem dolů) a kmene CCY 39-23-5 (SA-3, obr. vpravo, směrem nahoru), hodnota skóre: 2,942.

### 5.1.2.6 Rod *Pichia*

V rámci skupiny *Pichia kudriavzevii* byl analyzován sekvenovaný kmen *P. kudriavzevii* CCY 29-9-28 spolu s kmeny CCY 29-9-45 a CCY 29-9-26. Při porovnání kmene CCY 29-9-28 a CCY 29-9-26, bylo, až na jednu výjimku (metoda č. 2, sladivý agar), dosaženo hodnot v intervalu 2,000-2,999, a tudíž lze jednoznačně předpokládat, že kmen CCY 29-9-26 je kmenem druhu *P. kudriavzevii*. Toto tvrzení však neplatí pro kmen CCY 29-9-45, který v rámci srovnání se sekvenovaným kmenem nedosáhl ani jedné hodnoty vyšší než 0,798, a proto tento kmen se stoprocentní jistotou nepatří do skupiny *P. kudriavzevii*.

Fylogenetickou skupinu *Pichia fermentans* tvoří sekvenovaný kmen CCY 39-4-2 spolu s kmenem CCY 39-4-5, i když při vzájemném porovnání těchto kmenů nebylo dosaženo ve všech případech hodnot v intervalu 2,000-3,000. Výjimku tvořilo srovnání v rámci metody č. 1 a 2. na sladivém agaru, kdy byla hodnota skóre 1,242 a 1,925. Při porovnání sekvenovaného kmene s potenciálním zástupcem druhu, kmenem CCY 39-4-6, byly sice na YPD médiu u metody č. 2 a 3. hodnoty vyšší než 2,000, ale na sladivém agaru byla úspěšnost mnohem nižší. Pouze u metody č. 3 byla hodnota skóre ve středním intervalu 1,700-1,999, zbylé hodnoty byly v rozmezí 0,000-1,700. Na základě takto nejasných výsledků byl kmen CCY 39-4-6 navržen na podrobnější identifikaci pomocí metod molekulární biologie.

Mezi zástupce fylogenetické skupiny *Pichia jadinii*, kromě sekvenovaného kmene CCY 29-38-75, patří prokazatelně také kmeny CCY 29-38-75 a CCY 29-38-81. Výsledky porovnání se sekvenovaným kmenem byly u obou analyzovaných kmenů ve většině případů v intervalu 2,000-3,000, pouze jednou u kmene CCY 29-38-75 bylo skóre nižší a to konkrétně 1,422

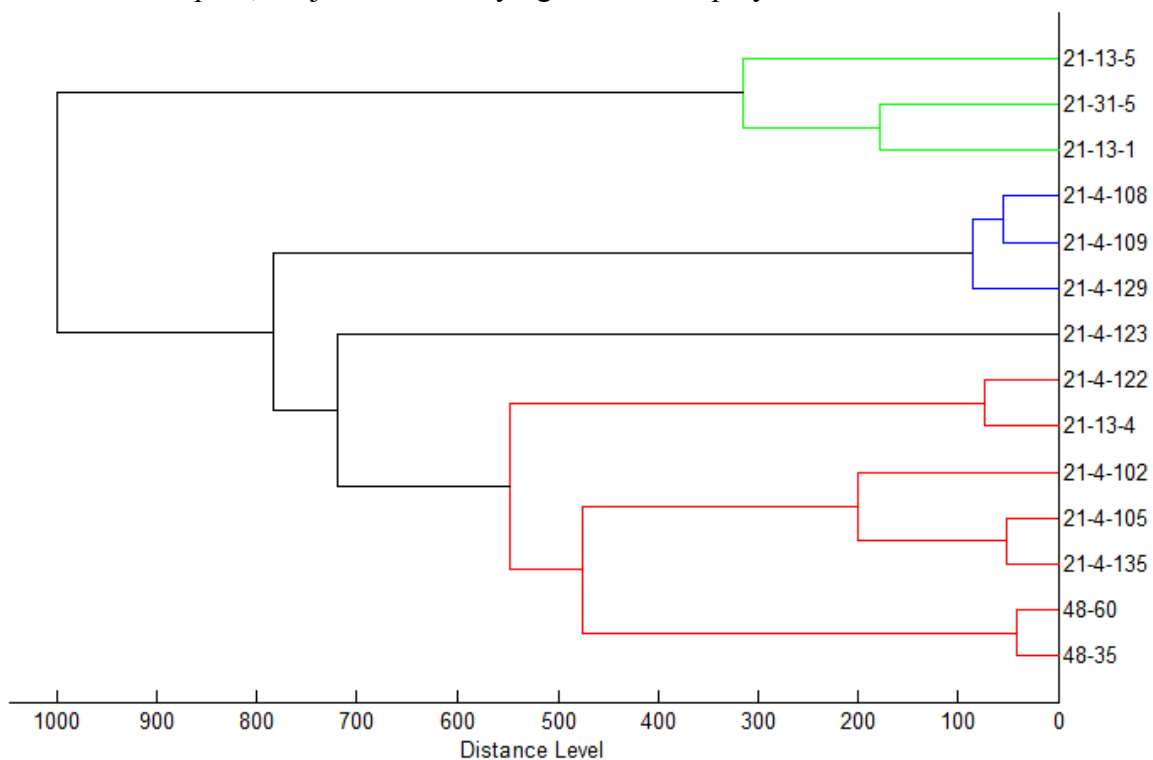
z důvodu nevyhovující kvality hmotnostního spektra. U kmene CCY 29-38-81 bylo na sladidlovém agaru v rámci metody č. 1 a 3. dosaženo hodnot v intervalu 1,777-1,999.

Čtvrtá fylogenetická skupina v rámci rodu *Pichia* – *Pichia kluyveri* obsahuje sekvenovaný kmen 39-31-19. Dalšími jednoznačně potvrzenými zástupci skupiny jsou kmeny CCY 39-31-4 a CCY 39-31-9, v rámci kterého bylo dosaženo vysokých hodnot skóre až 2,690. Posledním zástupcem této fylogenetické skupiny je kmen CCY 29-9-45, který byl původně označen jako kmen druhu *Pichia kudriavzevii*.

### 5.1.2.7 Rod *Saccharomyces*

Celkem čtyři fylogenetické skupiny tvoří kmeny identifikované jako zástupci rodu *Saccharomyces*. Fylogenetická skupina *Saccharomyces bayanus* zahrnuje sekvenovaný kmen CCY 21-13-1 a kmen CCY 21-31-5. Původně byl jako zástupce této skupiny navržen i kmen CCY 21-13-5. Nicméně vzhledem ke skutečnosti, že skóre získaná srovnáním se sekvenovaným kmenem dosahovala hodnot pouze v intervalu 0,000-1,699, byl kmen CCY 21-13-5 navržen na sekvenaci domény D1/D2 26S rRNA.

Druhá fylogenetická skupina rodu *Saccharomyces* nese označení *Saccharomyces pastorianus*. Do této skupiny byly, jako potenciální zástupci, zařazeny kmeny CCY 48-35 a CCY 48-60. Tyto dva kmeny však byly porovnány pouze mezi sebou, protože pro tuto skupinu nebyl k dispozici sekvenovaný kmen *S. pastorianus*. Bylo zjištěno, že se jedná o totožné kmeny, neboť veškeré skóre nabývalo hodnot v intervalu 2,000-3,000. Na druhou stranu se pravděpodobně nejedná o kmeny druhu *S. pastorianus*, ale *S. cerevisiae*. Toto tvrzení plyne z dendrogramu pro rod *Saccharomyces* (Obr. 35), kde tyto dva kmeny netvoří samostatnou skupinu, ale jsou součástí fylogenetické skupiny *S. cerevisiae*.



**Obr. 35** Dendrogram pro rod *Saccharomyces* (zeleně – *S. bayanus*, modře – *S. paradoxus*, červeně – *S. cerevisiae*).

Do fylogenetické skupiny *Saccharomyces paradoxus* byl zařazen sekvenovaný kmen CCY 21-4-109 a také kmen CCY 21-4-129, u kterého nebylo původně jisté, zda se jedná o kmen druhu *S. paradoxus* nebo *S. cerevisiae*. Kmen CCY 21-4-108 byl primárně zařazen mezi zástupce druhu *S. cerevisiae*, ale při porovnání s kmenem CCY 21-4-129 byla podobnost natolik vysoká, že byl kmen CCY 21-4-108 jednoznačně přeřazen do fylogenetické skupiny *S. paradoxus*.

Poslední fylogenetická skupina rodu *Saccharomyces* – *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje sekvenovaný kmen CCY 21-4-105, CCY 21-4-102, CCY 21-4-135, CCY 21-4-122 a CCY 21-13-4. V dendrogramu pro rod *Saccharomyces* (**Obr. 35**) je jasně viditelné, že kromě výše uvedených kmenů budou pravděpodobnými zástupci skupiny také kmeny CCY 48-35 a CCY 48-60, původně označené jako *S. pastorianus*. Původně byl mezi zástupce této skupiny řazen i kmen CCY 21-4-123, nicméně v dendrogramu (**Obr. 35**) je jeho zařazení nejasné, a tudíž byl kmen CCY 21-4-123 navržen na sekvenování.

#### 5.1.2.8 Rod *Torulaspóra*

Do fylogenetické skupiny *Torulaspóra delbrueckii* byl zařazen sekvenovaný kmen s označením CCY půda 83 a také kmen CCY půda 78, který až na výjimku (Metoda č. 1, médium YPD), dosáhl v porovnání se zmíněným sekvenovaným kmenem hodnot skóre vyšších než 2,000. Naproti tomu kmen CCY 21-22-8 byl navržen na sekvenování, neboť výsledné hodnoty skóre při porovnání s oběma potvrzenými kmeny byly v nejnižším intervalu 0,000-1,699.

#### 5.1.2.9 Rod *Wickerhamomyces*

Na základě výsledků porovnání se sekvenovaným kmenem CCY 38-1-35 *Wickerhamomyces anomalus* byly kmeny CCY 38-1-37 a CCY 38-1-34 zařazeny do fylogenetické skupiny *Wickerhamomyces anomalus*. Úspěšnost identifikace u obou kmenů byla téměř stoprocentní. Výjimkou bylo srovnání sekvenovaného kmene s kmenem CCY 38-1-34 na sladínovém agaru, kdy u obou kmenů nebyla kvalita spektra vyhovující, a tudíž nebyla hodnota skóre vyšší než 2,000.

#### 5.1.2.10 Rod *Zygosaccharomyces*

Potvrzenými zástupci fylogenetické skupiny *Zygosaccharomyces bailii* jsou kmeny CCY 35-6-7 a CCY 35-6-5, přičemž kmen CCY 35-6-7 je součástí skupiny 18 původně sekvenovaných kmenů.

Kmen CCY 35-6-3 byl porovnán s výše uvedenými kmeny. Na obou kultivačních médiích v rámci všech tří metod přípravy a aplikace vzorku byly získány hodnoty skóre, které náležely do nejnižšího intervalu 0,000-1,699. Vzhledem k tomu, že v několika případech bylo skóre nulové a maximální dosažené skóre nabývalo hodnoty 0,637, bylo jednoznačně stanoveno, že se nejedná o zástupce druhu *Z. bailii*.

Na základě výsledků dendrogramu vybraných kmenů byl kmen CCY 35-6-3 porovnán se sekvenovaným kmenem *Wickerhamomyces anomalus* (CCY 38-1-35). Díky tomu, že naprostá většina hodnot skóre byla v intervalu 2,000-3,000 (**Tab. 16**), byla podobnost obou kmenů natolik vysoká, že kmen CCY 35-6-3 byl zařazen mezi zástupce druhu *W. anomalus*.

**Tab. 16** Hodnoty skóre porovnání sekvenovaného kmene CCY 38-1-35 a kmene CCY 35-6-3.

Kmeny	Metoda a kultivační médium					
	1 YPD	1 SA	2 YPD	2 SA	3 YPD	3 SA
38-1-35 (S) a 35-6-3						
<b>Skóre</b>	2,326	2,101	2,631	2,051	2,737	1,901

#### 5.1.2.11 Kmen CCY 29-2-144

Izolát s označením CCY 29-2-144 nebyl taxonomicky zařazen a i jeho původ byl neznámý. Proto byl porovnán se sekvenovanými kmeny a několika dále vybranými ze všech analyzovaných kmenů.

Nejvyšší podobnosti bylo dosaženo porovnáním s kmeny CCY 29-2-15, CCY 29-2-21, CCY 29-2-129 a CCY 29-2-133, které jsou považovány za možné zástupce druhu *M. pulcherrima*. Protože nebylo jisté, zda se opravdu jedná o zástupce tohoto druhu, byl kmen CCY 29-2-144 navržen na sekvenaci domény D1/D2 26S rRNA.

## 5.2 Sekvence domény D1/D2 oblasti 26S rRNA genu

U 15 kmenů bylo nezbytné, pro jejich identifikaci a správné taxonomické zařazení, provést sekvenaci domény D1/D2 oblasti 26S rRNA. Původní taxonomické zařazení kmenů, výsledky sekvenční analýzy a procentuální podobnost získaných sekvencí se sekvencemi v databázích *Mycobank* a *BLAST*<sup>®</sup> jsou shrnuty v **Tab. 17**.

**Tab. 17** Původní taxonomické zařazení kmenů, výsledky sekvenování a procentuální podobnost kmenů.

Číslo CCY	Původní označení kmene	Výsledky sekvenování	Procentuální podobnost [%]
021-004-105	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100,000
021-004-123	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100,000
021-013-005	<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>	100,000
021-022-008	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<i>Lachancea thermotolerans</i>	100,000
025-006-031	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	–	0,000
026-009-022	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida pseudoglaebosa</i>	100,000
029-002-015	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia fructicola</i>	100,000
029-002-024	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia fructicola</i>	100,000
029-002-121	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	100,000
029-002-135	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	97,120
029-002-144	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	98,560
029-008-010	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99,809
039-004-006	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Pichia fermentans</i>	99,808
039-023-003	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100,000
000-048-035	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100,000

Metoda sekvenování domény D1/D2 26S rRNA umožnila přesnou identifikaci 14 kmenů z 15. Jediný kmen CCY 25-6-31, původně označený jako *Hanseniaspora uvarum*, nebyl správně sekvenován, a proto byla izolace DNA a sekvenování opakováno.

Úspěšná však byla tato technika v případě obtížně rozlišitelných sesterských kmenů *M. pulcherrima* a *M. fructicola* nebo dvojice *M. guilliermondii* a *M. caribbica*, při jejichž identifikaci i metoda sekvenování domény D1/D2 LSU rRNA často poskytuje rozpoluplné výsledky [36].

Procentuální shoda sekvencí analyzovaných kmenů se sekvencemi v databázích dosáhla v deseti případech maximální možné hodnoty, tedy 100 %. Ve zbylých případech, kromě kmene CCY 25-6-31, byla podobnost v rozmezí 97,120-99,809 %.

Výsledky identifikace u osmi kmenů byly shodné s původně navrženým označením, jejich taxonomické zařazení tak bylo potvrzeno. Naopak zbylých šest kmenů bylo identifikováno jako jiný druh.

### **Skupina *Saccharomyces***

V případě kmene CCY 21-4-105, který byl dříve sekvenován, bylo znovu potvrzeno, že se jedná o kmen druhu *S. cerevisiae* a je tak součástí fylogenetické skupiny *S. cerevisiae*. Totéž platí pro kmen CCY 21-4-123, u něhož byly výsledky MALDI-TOF biotypizace nejednoznačné a kmen CCY 48-35, který byl původě označen za *S. pastorianus*. Navíc kmen CCY 48-35 vykazoval vysokou podobnost v rámci biotypizace s kmenem CCY 48-60, který byl na základě těchto výsledků s jistotou zařazen do fylogenetické skupiny *S. cerevisiae*.

Kmen CCY 21-13-5 byl původně označen jako *S. bayanus*, přesto však při srovnání se sekvenovaným kmenem *S. bayanus* (CCY 21-13-1) vykazoval velmi nízkou shodu a navíc i hmotnostní spektra byla z hlediska kvality zařazena do 3. kategorie. Až sekvenování domény D1/D2 26S rRNA ukázalo, že kmen CCY 21-13-5 je opravdu zástupce fylogenetické skupiny *S. bayanus*.

### **Skupina *Torulaspora***

Kmen CCY 21-22-8, který byl na základě mikrobiologických metod označen za kmen druhu *Torulaspora delbrueckii*, byl podle výsledků sekvenční analýzy identifikován se 100% podobností jako druh *Lachancea thermotolerans*, který tak reprezentuje samostatnou fylogenetickou skupinu.

Tyto dva druhy je velmi obtížné rozlišit na fenotypové úrovni konvenčními metodami, ale i biotypizací MALDI-TOF, neboť vykazují na tuhém agaru téměř identický vzhled kolonií a navíc se shodují i z hlediska tvaru buněk. Vysoké podobnosti je však dosaženo i v rámci kvašení sacharidových substrátů.

### **Skupina *Debaryomyces***

Kmen CCY 26-9-22, původně označený jako *Debaryomyces hansenii*, byl identifikován jako jiný druh – *Candida pseudoglebosa*, který tak představuje další samostatnou fylogenetickou skupinu.

Stejně jako v předešlém případě, je obtížné oba druhy identifikovat na fenotypové úrovni, neboť se shodují ve vzhledu kolonií i buněk. Značná podobnost je i u kvašení sacharidových substrátů. Na základě výsledků biotypizace nebylo možné tyto druhy rozlišit, protože v polovině případů bylo dosaženo hodnoty skóre 0,000 a to díky kvalitě spekter, která náležela do 3. nebo nevyhovující kategorie.

### **Skupina *Metschnikowia***

Do nově vytvořené fylogenetické skupiny *M. fructicola* byl zařazen sekvenovaný kmen CCY 29-2-15 a CCY 29-2-21, který se sekvenovaným kmenem vykazoval v rámci biotypizace vysokou podobnost. Taktéž CCY 29-2-24 je prokázaným zástupcem této skupiny, stejně jako CCY 29-2-129 a CCY 29-2-133.

Fylogenetická skupina *M. pulcherrima* nově obsahuje, díky sekvenování, kmen CCY 29-2-121, CCY 29-2-135 a CCY 29-2-144.

Zástupci rodu *Metschnikowia* – *Metschnikowia pulcherrima* a *Metschnikowia fructicola* jsou považovány za sesterské kmény a vykazují vysokou genetickou podobnost. Fenotypově, z hlediska vzhledu kolonií a buněk, jsou tyto dva druhy téměř totožné. V rámci kvašení

sacharidů existuje mezi těmito druhy jediný rozdíl, kdy *M. fructicola* prokazatelně využívá glukózu, zatímco *M. pulcherrima* pouze velmi slabě.

Při biotypizaci těchto kmenů, které byly původně označeny pouze jako *M. pulcherrima*, naznačovaly výsledky, že tyto kmeny nebudou patřit pouze do skupiny *M. pulcherrima*, ale jejich stoprocentní identifikace pouze na základě biotypizace nebyla možná.

### **Skupina *Pichia***

Kmen CCY 39-4-6 byl původně označen jako kmen druhu *P. fermentans*, avšak jeho výsledky biotypizace MALDI-TOF, při srovnání se sekvenovaným kmenem CCY 39-4-2, nebyly dostatečně prokazatelné. Až sekvenováním domény D1/D2 bylo zjištěno, že kmen CCY 39-4-6 je součástí fylogenetické skupiny *P. fermentans*.

### **Skupina *Meyerozyma***

Kmen CCY 39-23-3 byl nejprve identifikován jako kmen druhu *M. guilliermondii*. V rámci biotypizace však nebyly výsledky stoprocentně jasné. Sekvenováním bylo zjištěno, že se nejedná o *M. guilliermondii*, ale o blíže příbuzný druh *M. caribbica*.

## 5.3 Stanovení vybraných charakteristik kvasinek

### 5.3.1 Kvašení

Pro dvacet vybraných kmenů byla provedena kvasná zkouška na šesti sacharidových substrátech. Vzhledem k tomu, že kmen CCY 25-6-31 nebyl správně sekvenován a tudíž není jasné, o jaký druh se jedná, bylo kvašení posouzeno pro celkem 19 kmenů.

Výsledky kvašení, které jsou shrnuty v **Tab. 18**, byly porovnány s dostupnou literaturou, konkrétně s publikací *The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th Edition* (Kurtzmann, Fell, Boekhout, 2011).

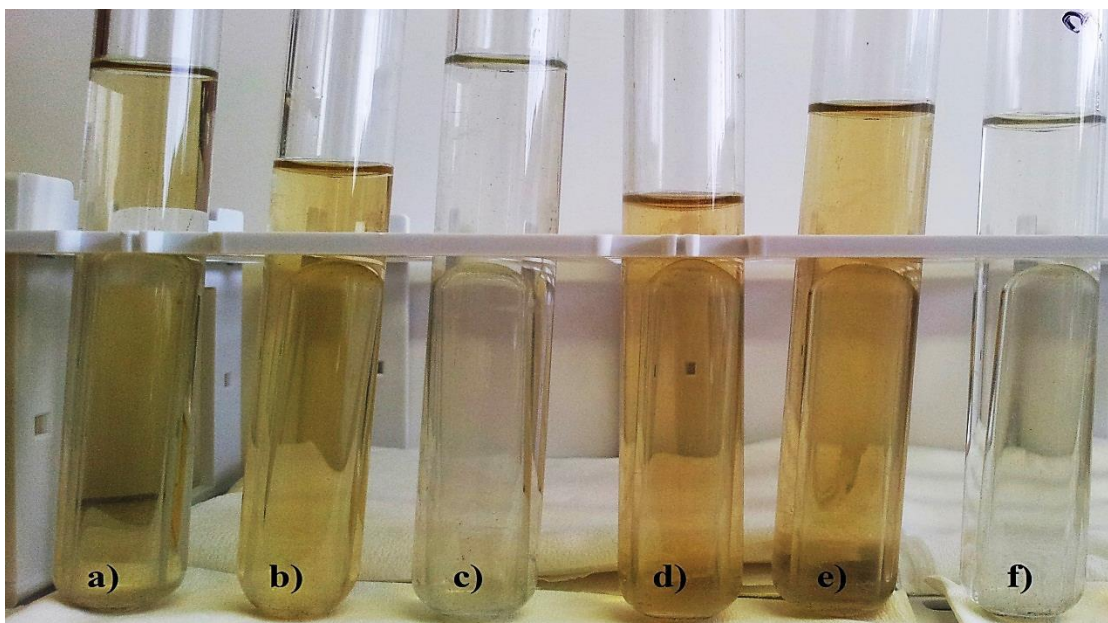
**Tab. 18** Výsledky kvašení pro dvacet sledovaných kmenů kvasinek.

Číslo CCY	Druh	Glukóza	Maltóza	Sacharóza	Laktóza	Galaktóza	Rafinóza
021-004-109	<i>Saccharomyces paradoxus (S)</i>	+	+	+	-	+	+
021-004-129	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	+	+	+	-	+	+
021-013-005	<i>Saccharomyces bayanus</i>	+	+	+	-	+	+
021-022-008	<i>Lachancea thermotolerans</i>	+	+	+	-	+	+
025-006-031	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	-	-	-	-	-
029-001-021	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	+	-	-	-	-	-
029-002-121	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+	-	-	-	-	-
029-008-008	<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	-	+	-	+	+
029-009-028	<i>Pichia kudriavzevii (S)</i>	+	-	-	-	-	-
029-038-075	<i>Pichia jadinii (S)</i>	+	-	+	-	-	+
035-006-005	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-	-	-	-	-	-
038-001-035	<i>Wickerhamomyces anomalus (S)</i>	+	+	+	-	+	+
039-004-006	<i>Pichia fermentans</i>	+	-	-	-	-	-
039-023-012	<i>Meyerozyma guilliermondii (S)</i>	+	-	+	-	-	+
039-031-004	<i>Pichia kluyveri</i>	+	-	-	-	-	-
041-006-021	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	+	-	-	-
046-001-002	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	-	-	-	-	-
000-048-035	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	-	+	+
050-002-002	<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	-	+	-	+	+
051-001-001	<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	-	+	-	+	+

Pozn. (+) – kvasí daný substrát, (-) – nekvasí daný substrát

U 18 kmenů byly výsledky kvašení shodné s dostupnou publikací. Nutno uvést, že ve spoustě případů bylo v literatuře uvedeno, že kvašení konkrétního sacharidu může být variabilní, tzn., že kmen může, ale i nemusí kvasit daný typ sacharidu. Názorným příkladem je kmen CCY 41-6-21 *Debaryomyces hansenii*, který dle dostupného zdroje neutilizuje laktózu, ale kvašení zbylých sacharidů – glukózy, maltózy, sacharózy, galaktózy a rafinózy je variabilní. Na základě výsledků v **Tab. 18** je potvrzeno, že *D. hansenii* nekvasí laktózu. Zároveň však tento kmen nekvasí ani maltózu, galaktózu a rafinózu, ale glukózu a sacharózu naopak ano.

Pouze v jednom jediném případě neodpovídaly výsledky kvasné zkoušky literatuře. Kmen CCY 35-6-5, identifikovaný jako druh *Zygosaccharomyces bailii*, nevykazoval ani v jedné ze zkumavek náznak jakéhokoliv kvašení, jak je patrné na **Obr. 36**.



**Obr. 36** Kvasná zkouška kmene CCY 35-6-5 na šesti sacharidových substrátech: a) glukóza, b) maltóza, c) sacharóza, d) laktóza, e) galaktóza, f) rafinóza.

Naproti tomu publikace uvádí, že tento druh využívá glukózu, ale nikoliv galaktózu, maltózu, laktózu a rafinózu. Kvašení sacharózy je pak označeno jako variabilní. Pravděpodobným důvodem, proč nebyl v případě glukózy pozorován žádný vznikající oxid uhličitý ani zákal, je to, že tento kmen využívá glukózu velmi pomalu a samotné kvašení je tudíž pozorovatelné až po více než 14 dnech od začátku testu.

V případě kmenů CCY 29-8-8, CCY 50-2-2, CCY 51-1-1, označených jako kmeny druhu *Kluyveromyces lactis*, lze na základě výsledků kvašení zjistit, o jakou varietu druhu se jedná. V **Tab. 18** jsou výsledky pro tři uvedené kmeny totožné a využívají tedy glukózu, sacharózu, galaktózu, rafinózu, ale nikoliv maltózu a laktózu. A právě kvašení laktózy je ukazatelem pro rozlišení mezi domestikovanou varietou *K. lactis* var. *lactis* a divokými kmeny variety *K. lactis* var. *drosophilarum*, přičemž varieta *lactis* využívá laktózu, zatímco *drosophilarum* nikoliv. Uvedené kmeny jsou tedy na základě kvasné zkoušky označeny jako variety *K. lactis* var. *drosophilarum*.

Variety existují i v případě druhu *Saccharomyces bayanus* (CCY 21-13-5) – *S. bayanus* var. *bayanus* a *S. bayanus* var. *uvarum*. Tyto variety však nelze pomocí kvasné zkoušky rozlišit, neboť dosahují shodných výsledků na šesti uvedených substrátech.

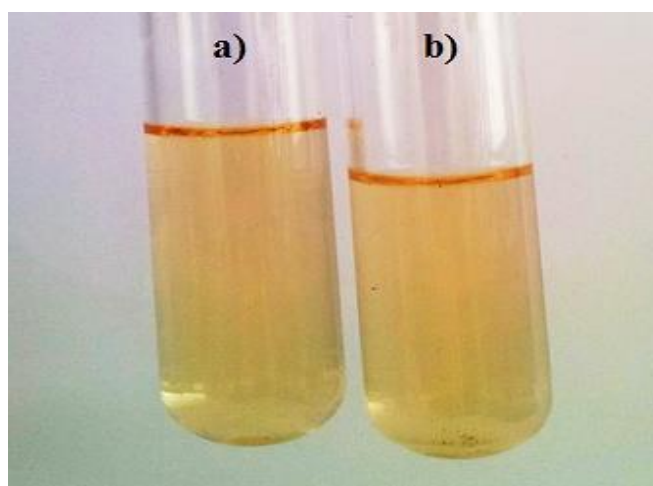
V případě druhů rodu *Saccharomyces* – *S. paradoxus* (CCY 21-4-109), *S. bayanus* (CCY 21-13-5) a *S. cerevisiae* (CCY 48-35) byly výsledky totožné. Přesto, že se jedná o kmeny různých druhů, nelze je prakticky na základě kvašení identifikovat. Dle literatury tyto druhy využívají glukózu, sacharózu a laktózu. Variabilní je pak kvašení maltózy a galaktózy v případě druhu *S. paradoxus*. Zatímco pro druhy *S. bayanus* a *S. cerevisiae* je variabilní pouze kvašení galaktózy.

Totéž platí pro druhy rodu *Metschnikowia* – *M. pulcherrima* (CCY 29-2-121) a *M. reukaufii* (CCY 29-1-21), jejichž společným znakem je kvašení glukózy a variabilně také galaktózy. Naopak oba druhy nekvasí zbývající testované sacharidy.

Obdobná situace nastává u zástupců rodu *Pichia*, kdy *P. fermentans* (CCY 39-4-6), *P. kudriavzevii* (CCY 29-9-28) a *P. kluyveri* (CCY 39-31-4) vykazují taktéž shodné výsledky kvašení. Tyto druhy využívají pouze glukózu a zbylé testované sacharidy nikoliv. Naproti tomu *P. jadinii* (CCY 29-38-75) kvasí kromě glukózy také sacharózu a rafinózu.

### 5.3.2 Stanovení přítomnosti ureázy

Při stanovení přítomnosti ureázy byla po dobu 14 dní sledována barva média. V průběhu i po uplynutí doby pozorování nedošlo k barevné změně ani u jednoho testovaného kmene a původní jantarově-žlutá barva byla zachována bez jakýchkoliv náznaků počínajícího růžového zbarvení. Příklad výsledků testu pro kmeny CCY 50-2-2 a CCY 39-4-6 je uveden na **Obr. 37**.



**Obr. 37** Výsledky stanovení přítomnosti ureázy pro kmeny CCY 39-4-6 (a) a CCY 50-2-2 (b).

Na základě těchto výsledků a porovnání s dostupnou publikací – *The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th Edition* (Kurtzmann, Fell, Boekhout, 2011), bylo potvrzeno, že veškeré analyzované kmeny jsou kmeny druhů askomycetních kvasinek.

### 5.3.3 Stanovení konstanty radiálního růstu

Veškeré kmeny byly kultivovány po celou dobu za přítomnosti kyslíku a na sladidinovém agaru v Petriho miskách. V **Tab. 19** jsou shrnuty naměřené hodnoty průměrů kolonií na počátku kultivace a po 21 dnech a současně také vypočtené hodnoty konstant radiálního růstu pro všech 20 pozorovaných kmenů kvasinek.

Obecně jsou jako stěžejní faktory ovlivňující růst kvasinek považovány: dostupnost a vyčerpání živin (glukózy), přítomnost kyslíku a akumulace toxických metabolitů. Záleží, však také při jaké teplotě jsou kvasinky kultivovány, neboť každá disponuje určitým teplotním optimem, při kterém je růst maximální, případně zda se nejedná o mutantní kmen, jehož růst může být značně odlišný ať už v rámci rychlosti růstu nebo i vzhledu kolonií.

**Tab. 19** Naměřené hodnoty průměrů kolonií a vypočtené hodnoty konstanty radiálního růstu  $k_r$  pro dvacet sledovaných kmenů.

Číslo CCY	Druh	$r_0$ [mm]	$r_t$ [mm]	$t$ [hod]	$t_0$ [hod]	$k_r$ [mm po 100 hod. kultivace při 17-20 °C]
021-004-109	<i>S. paradoxus</i>	6	20	504	24	2,917
021-004-129	<i>S. paradoxus</i>	6	21	504	24	3,125
021-013-005	<i>S. bayanus</i>	6	21	504	24	3,125
021-022-008	<i>L. thermotolerans</i>	10	25	504	24	3,125
025-006-031	<i>H. uvarum</i>	5	23	504	24	3,750
029-001-021	<i>M. reukaufii</i>	6	12	504	24	1,250
029-002-121	<i>M. pulcherrima</i>	4	19	504	24	3,125
029-008-008	<i>K. lactis</i>	4	20	504	24	3,333
029-009-028	<i>P. kudriavzevii</i>	10	49	504	24	8,125
029-038-075	<i>P. jadinii</i>	6	21	504	24	3,125
035-006-005	<i>Z. bailii</i>	6	15	504	24	1,875
038-001-035	<i>W. anomalus</i>	4	21	504	24	3,542
039-004-006	<i>P. fermentans</i>	8	32	504	24	5,000
039-023-012	<i>M. guilliermondii</i>	5	17	504	24	2,500
039-031-004	<i>P. kluyveri</i>	10	20	504	24	2,083
041-006-021	<i>D. hansenii</i>	5	21	504	24	3,333
046-001-002	<i>H. guilliermondii</i>	6	32	504	24	5,417
000-048-035	<i>S. cerevisiae</i>	5	20	504	24	3,125
050-002-002	<i>K. lactis</i>	9	28	504	24	3,958
051-001-001	<i>K. lactis</i>	14	65	504	24	10,625

V **Tab. 19** je patrné, že více než polovina kmenů dosahuje hodnoty konstanty radiálního růstu v rozmezí 1,250-3,958, přičemž nejčastější hodnota je 3,125. U čtyř kmenů byla konstanta radiálního růstu výrazně vyšší než u zbývajících kmenů a nejvyšší hodnoty – 10,625, bylo dosaženo u kmene CCY 51-1-1 *Kluyveromyces lactis*.

V případě kmenů, u kterých dosahovala konstanta radiálního růstu nižších hodnot (1,250-3,958), byl jasně viditelný rozdíl v charakteru růstu oproti kmenům s několikanásobně vyššími hodnotami. Kolonie o menším průměru narostly podstatně více do výšky, čili jejich profil byl mnohonásobně vyšší a textura viditelně plnější až máslovitého charakteru, často bez náznaku rýhování. Kolonie s vyšší hodnotou  $k_r$  měly plochý profil, případně vyvýšený, ale zato výrazně členitější například s rýhami nebo kořínkovou strukturou.

## 6 ZÁVĚR

Hlavním cílem práce byla identifikace a taxonomické zařazení 84 kmenů kvasinek na úrovni druhu. Současně byla rozšířena databáze referenčních hmotnostních spekter Sbírký kultur kvasinek pro analýzu nově získaných izolátů kvasinek.

Z hlediska metody přípravy aplikace a vzorku se nejlépe osvědčila metoda č. 2, v rámci které ani jedno hmotnostní spektrum nespadlo do kategorie „nevyhovující“ a pouze 10 spekter bylo zařazeno do 3. kategorie. Úspěšnost této metody, jejíž postup je identický s metodou firmy Bruker Daltonik, spočívá ve výběru matrice. Zmíněná metoda firmy Bruker (metoda č. 1) využívá matici CHCA, která je však vhodná pro analýzu v nižším rozsahu m/z. Naproti tomu matrice SAFA, vzniklá smícháním kyselin sinapové a ferulové v poměru 1:1, představuje kombinaci vhodnou pro vizualizaci proteinů v širokém rozsahu m/z s téměř 100% úspěšností při použití YPD jako kultivačního média.

Klíčovým krokem pro získání optimálních výsledků v rámci biotypizace je volba kultivačního média a metody přípravy a aplikace vzorku. V rámci této práce byla pro biotypizaci použita dvě kultivační média a celkem tři metody přípravy a aplikace vzorku. Při posouzení kvality naměřených hmotnostních spekter bylo jako nejvýhodnější médium pro účely biotypizace označeno YPD. Převaha YPD média nad sladidovým agarem je patrně dána složením, díky čemuž byly kultury na šikmých agarech za stejných kultivačních podmínek podstatně více narostlé do plochy i výšky a pravděpodobně produkovaly méně extracelulárních látek, které by mohly znemožňovat správnou identifikaci.

V rámci identifikace vybraných kmenů za použití konvenčních mikrobiologických metod bylo sledováno kvašení, vzhled buněk, kolonií a kultur v tekutém a tuhém médiu, konstanta radiálního růstu a přítomnost ureázy. Výsledky těchto stanovení prokázaly, že se jedná o kmeny druhů askomycetních kvasinek, dále umožnily popis vzhledu a charakteru buněk, kolonií, kultur a poskytly informace o kvašení sacharidů. Avšak přesná a stoprocentní identifikace kmenů na úrovni druhu, pouze na základě těchto výsledků, není možná. V rámci zařazení na úrovni rodů jsou například u kvašení nebo i posouzení vzhledu patrné charakteristické rozdíly, ale opět nelze v některých případech jednoznačně konstatovat, že daný kmen je potvrzeným zástupcem rodu. Vzhledem k tomu, že počet nově izolovaných kmenů narůstá a jejich podobnost z hlediska fenotypu je v mnoha případech vysoká, slouží tyto metody pouze k orientačnímu určení o jaký druh se jedná a pro popis charakteristik jako je právě kvašení nebo vzhled kolonií a buněk.

Naproti tomu biotypizace MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií je vhodnou technikou pro taxonomické zařazení kvasinek na úrovni druhu, avšak ne vždy stoprocentně úspěšnou. Celkově se podařilo správně identifikovat 51 kmenů z 66 (počet bez původně 18 sekvenovaných kmenů), což odpovídá 77% úspěšnosti. V některých případech díky nevyhovujícím spektrům musela být biotypizace opakována a v několika dalších případech nebyla identifikace možná díky nulovým hodnotám skóre. Zbývající kmeny představovaly natolik geneticky podobné zástupce, že je fenotypově ani pomocí MALDI-TOF nebylo možné rozlišit. Ačkoliv je biotypizace MALDI-TOF hojně využívanou a mnohonásobně rychlejší alternativou metod molekulární biologie, stále nedokáže ve všech případech konkurovat sekvenování, které je u těžko rozlišitelných kmenů kvasinek primárně zaměřeno na doménu D1/D2 26S rRNA. Tato doména představuje natolik specifickou sekvenci, že postačuje

k rozlišení i sesterských kmenů *Metschnikowia pulcherrima* a *Metschnikowia fructicola*, nebo zástupců rodu *Meyerozyma* – *Meyerozyma guilliermondii* a *Meyerozyma caribbica*, které se podařilo na základě sekvenování rozlišit a to i přesto, že některé studie uvádí, že sekvenování těchto domén v takovém případě nemusí být vždy prokazatelné. Až na výjimku (kmen CCY 25-6-31), byly na základě sekvenování domény D1/D2 26S rRNA identifikovány veškeré kmeny, které nebylo možné rozlišit pomocí biotypizace MALDI-TOF. Ačkoliv je sekvenování oproti biotypizaci podstatně náročnější z hlediska času i provedení analýzy a současně je závislé na kvalitě databáze, poskytuje jednoznačné výsledky i v případě blízké příbuzných druhů.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DEÁK, T. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007, 352 p. ISBN 978-1-4200-4493-5.
- [2] MCLAUGHLIN, D. J., E. G. MCLAUGHLIN and P. A. LEMKE, ed. *The Mycota: A comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research: VII Systematics and Evolution, part A*. 1st ed. Berlin: Springer-Verlag, 2001, 366 p. ISBN 3-540-58008-5.
- [3] *Taxonomy Browser* [online]. National Center for Biotechnology Information, 2017 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- [4] SCHAECHTER, M., ed. *Eukaryotic Microbes*. Cambridge (Massachusetts): Academic Press, 2011, 496 p. ISBN 978-0-12-383876-6.
- [5] KURTZMAN, C. P. and J. W. FELL. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. New York: Elsevier, 2000, 1082 p. ISBN 978-012-3848-680.
- [6] VAN DER REST, M. E., A. H. KAMMINGA, A. NAKANO, Y. ANRAKU, B. POOLMAN and W. N. KONINGS. The Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, Function, and Biogenesis. *Microbiological Reviews*, 1995, vol. 59, no. 2, p. 304-322. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239363/>
- [7] WATKINSON, S. C., L. BODDY and N. P. MONEY, ed. *The Fungi*. 3rd ed. London: Academic Press, 2016, 466 p. ISBN 978-0-12-382034-1.
- [8] KSCHISCHO, M., RAMOS, J. and H. SYCHROVÁ, ed. *Yeast Membrane Transport*. Berlin: Springer International Publishing, 2016, 378 p. ISBN 978-3-319-25302-2.
- [9] SPATAFORA, J. W. and MCLAUGHLIN, D. J., ed. *The Mycota: A comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research: VII Systematics and Evolution, part B*. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2015, 260 p. ISBN 978-3-662-46010-8.
- [10] NEIMAN, A. M. Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2005, vol. 69, issue 4, p. 565-584. DOI: 10.1128/MMBR.69.4.565-584.2005  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1306807/>
- [11] TROPP, B. E. *Molecular Biology: Genes to Proteins*. 4th ed. Burlington: Jones & Bartlett Publishers, Inc., 2011, 1097 p. ISBN 978-0-7637-8663-2.
- [12] THANGADURAI, D. and J. SANGEETHA, ed. *Industrial Biotechnology: Sustainable Production and Bioresource Utilization*. Oakville: Apple Academic Press, 2017, 484 p. ISBN 978-1-77188-262-0.
- [13] PITT, J. I. and A. D. HOCKING. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd ed. Sydney: Academic Press, 1997, 593 p. ISBN 978-1-4613-7936-2.
- [14] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

- [15] MATSUBARA, V. H., Y. WANG, H. M. H. N. BANDARA, M. P. A. MAYER and L. P. SAMARANAYAKE. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, vol. 100, issue 14, p. 6415-6426. DOI: 10.1007/s00253-016-7527-3.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7527-3>
- [16] ESSER, K., BENNETT, J. W. and H. OSIEWACZ, ed. *The Mycota: comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. X-Industrial Applications*. Berlin: Springer, 2002, 414 s. ISBN 978-3-642-07481-3.
- [17] TORTORELLO, M. L. and BATT, C. A., ed. *Encyklopedia of Food Microbiology*. 2nd ed. Academic Press, 2014, 3248 p. ISBN 978-0-12-384730-0.
- [18] BANJARA, N., K. W. NICKERSON, M. J. SUHR and H. E. HALLEN-ADAMS. Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, vol. 222, p. 23-29. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.016.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160516300174>
- [19] *Yeast & Mold: Hanseniaspora uvarum, Viticulture & Enology: Wine Associated Yeasts and Grape Fungi* [online]. The Regents of the University of California, Davis campus, 2014 [cit. 2016-04-01]. Dostupné z: [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/hanseniaspora\\_uvarum.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/hanseniaspora_uvarum.html)
- [20] *Hanseniaspora guilliermondii* Pijper [online]. Microbe Division (JCM): JCM On-line Catalogue of Strains, 2017 [cit. 2017-02-20].  
Dostupné z: [http://www.jcm.riken.go.jp/cgi-bin/jcm/jcm\\_number?JCM=5913](http://www.jcm.riken.go.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=5913)
- [21] *Hanseniaspora guilliermondii*. Search on: Yeast species [online]. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2017 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.westerdijkinstitut.nl/Collections/BioloMICS.aspx?TableKey=146826160000012&Rec=398&Fields=All>
- [22] *Hanseniaspora uvarum*. *Viticulture & Enology: Wine Associated Yeasts and Grape Fungi* [online]. The Regents of the University of California, Davis campus, 2014 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/hanseniaspora\\_uvarum.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/hanseniaspora_uvarum.html)
- [23] ALBERTIN, W., M. E. SETATI, C. MIOT-SERTIER, et al. *Hanseniaspora uvarum* from Winemaking Environments Show Spatial and Temporal Genetic Clustering. *Frontiers in Microbiology*. 2016, vol. 6, article 1569. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01569. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4718985/>
- [24] TRISTEZZA, M., M. TUFARIELLO, V. CAPOZZI, G. SPANO, G. MITA and F. GRIECO. The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. *Frontiers in Microbiology*. 2016, vol. 7, article 670. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00670.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4860541/>
- [25] LANE, M. M. and J. P. MORRISSEY. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*. 2010, vol. 24, issue 1-2, p. 17-26. DOI: 10.1016/j.fbr.2010.01.001.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1749461310000035>

- [26] *Kluyveromyces marxianus*. Search on: Yeast species [online]. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2017 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.westerdijkinstitute.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeasts%20species&Rec=439&Fields=All>
- [27] *Kluyveromyces marxianus*. *Viticulture & Enology: Wine Associated Yeasts and Grape Fungi* [online]. The Regents of the University of California, Davis campus, 2014 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/kluyveromyces\\_marxianus.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/kluyveromyces_marxianus.html)
- [28] *Kluyveromyces marxianus* (E. C. Hansen) van der Walt var. *lactis* (Dombrowski) Johannsen & van der Walt [online]. Microbe Division (JCM): JCM On-line Catalogue of Strains, 2017 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: [http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm\\_number?JCM=6846](http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=6846)
- [29] SPOHNER, S. C., V. SCHAUM, H. QUITMANN and P. CZERMAK. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 2016, vol. 222, p. 104-116. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.023. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816561630075X>
- [30] *Metschnikowia pulcherrima*. *Viticulture & Enology: Wine Associated Yeasts and Grape Fungi* [online]. The Regents of the University of California, Davis campus, 2014 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/metschnikowia\\_pulcherrima.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/metschnikowia_pulcherrima.html)
- [31] ORO, L., M. CIANI and F. COMITINI. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 2014, vol. 116, issue 5. DOI: 10.1111/jam.12446. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.12446/abstract>
- [32] TÜRKEL, S. and B. ENER. Isolation and Characterization of New *Metschnikowia pulcherrima* Strains as Producers of the Antimicrobial Pigment Pulcherrimin. *A Journal of Biosciences*. 2009, vol. 64, issue 5-6. DOI: 10.1515/znc-2009-5-618. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/znc.2009.64.issue-5-6/znc-2009-5-618/znc-2009-5-618.xml>
- [33] SIPIKZKI, M. *Metschnikowia* Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, vol. 72, issue 10, p. 6716-6724. DOI: 10.1128/AEM.01275-06. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1610289/>
- [34] SPENCER, J. F. T. and D. M. SPENCER, ed. *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Berlin: Springer-Verlag, 1997, 382 p. ISBN 978-3-642-08160-6.
- [35] VAN DER BERG, M. A and K. MARUTHACHALAM, ed. *Genetic Transformation Systems in Fungi: Volume I*. Berlin: Springer International Publishing, 2015, 318 p. ISBN 978-3-319-10141-5.
- [36] ROMI, W., S. KEISAM, G. AHMED and K. JEYARAM. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiology*, 2014, vol. 14, issue 52. DOI: 10.1186/1471-2180-14-52. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3946169/>

- [37] PAPON, N., V. SAVINI, A. LANOUE, et al., *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Current Genetics*, 2013, vol. 59, issue 3, p. 73-90. DOI: 10.1007/s00294-013-0391-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00294-013-0391-0>
- [38] *Pichia fermentans*. Search on: Yeast species [online]. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2017 [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: <http://www.westerdijknstitute.nl/Collections/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000012&Rec=570&Fields=All>
- [39] SANNA, M. L., S. ZARA, G. ZARA, Q. MIGHELI, M. BUDRONI and I. MANNAZZU. *Pichia fermentans* dimorphic changes depend on the nitrogen source. *Fungal Biology*, 2012, vol. 116, issue 7, p. 769-777. DOI: 10.1016/j.funbio.2012.04.008. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614612000797>
- [40] GIOBBE, S., S. MARCEDDU, B. SCHERM, G. ZARA, V. L. MAZZARELLO, M. BUDRONI and Q. MIGHELI. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Research*, 2007, vol. 7, issue 8, p. 1389-1398. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2007.00301.x. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17727660>
- [41] CHAUHAN, R., A. REDDY and J. ABRAHAM. Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using *Pichia fermentans* JA2 and their antimicrobial property. *Applied Nanoscience*, 2015, vol. 5, issue 1, p. 63-71. DOI: 10.1007/s13204-014-0292-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s13204-014-0292-7>
- [42] BATISTA, N. N., C. L. RAMOS, D. D. RIBEIRO, A. C. M. PINHEIRO and R. F. SCHWAN. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT – Food Science and Technology*, 2015, vol. 63, issue 1, p. 221-227. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.03.051. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815002042>
- [43] MASOUD, W. and L. JESPERSEN. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, vol. 110, issue 3, p. 291-296. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.030. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160506002595>
- [44] CHAN, G. F., H. M. GAN, H. L. LING and N. A. A. RASHID. Genome Sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a Potential Producer of Bioethanol and Phytase. *Eukaryotic Cell*, 2012, vol. 11, issue 10. DOI: 10.1128/EC.00229-12. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23027839>
- [45] LI, C., J. YU, D. WANG, L. LI, X. YANG, H. MA and Y. XU. Efficient removal of zinc by multi-stress-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* A16. *Bioresource Technology*, 2016, vol. 206, p. 43-49. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.057. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416300335>
- [46] *Candida utilis*. Search on: Mycobank [online]. International Mycological Association (IMA), 2016 [cit. 2017-02-25]. Dostupné z: <http://www.mycobank.org/name/Candida%20utilis>

- [47] *Pichia jadinii*. Search on: Yeast species [online]. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2017 [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: <http://www.westerdijkinstitut.nl/collections/BioloMICS.aspx?Table=YeastSpecies&Name=Pichia%20jadinii&Fields=All&ExactMatch=T>
- [48] WEBSTER, J. and R. W. S. WEBER. *Introduction to Fungi*. 3rd ed. Cambridge: University Press, 2007, 867 p. ISBN 978-0-521-80739-5.
- [49] BUERTH, C., D. TIELKER and J. F. ERNST. *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: yeast relatives with expanding applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, vol. 100, issue 16, p. 6981-6990. DOI: 10.1007/s00253-016-7700-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7700-8>
- [50] GONZÁLEZ, S. S., E. BARRIO, J. GAFNER and A. QUEROL. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 2006, vol. 6, issue 8, p. 1221-1234. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00126.x. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17156019>
- [51] ADT, I., A. KOHLER, S. GOGNIES, J. BUDIN, C. SANDT, A. BELARBI, M. MANFAIT and G. D. SOCKALINGUM. FTIR spectroscopic discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 2010, vol. 56, issue 9, p. 793-801. DOI: 10.1139/w10-062. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921989>
- [52] WALTHER, A., A. HESSELBART and J. WENDLAND. Genome Sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the World's First Pure Culture Lager Yeast. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2014, vol. 4, issue 5, p. 783-793. DOI: 10.1534/g3.113.010090. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4025477/#>
- [53] NATHANAIL, A. V., B. GIBSON, L. HAN, K. PELTONEN, V. OLLILAINEN, M. JESTOI and A. LAITILA. The lager yeast *Saccharomyces pastorianus* removes and transforms *Fusarium* trichothecene mycotoxins during fermentation of brewer's wort. *Food Chemistry*, 2016, vol. 203, p. 448-455. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.070. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616302321>
- [54] Strain data: *Saccharomyces pastorianus* [online]. Microbe Division (JCM), 2017 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: [http://www.jcm.riken.go.jp/cgi-bin/jcm/jcm\\_kojin?ANY=electrophoretic](http://www.jcm.riken.go.jp/cgi-bin/jcm/jcm_kojin?ANY=electrophoretic)
- [55] *Saccharomyces pastorianus*. Search on: Yeast species [online]. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2017 [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: <http://www.westerdijkinstitut.nl/Collections/BioloMICS.aspx?TableKey=1468261600000089&Rec=1077&Fields=All>
- [56] ORLIĆ, S., F. N. ARROYO-LÓPEZ, K. HUIĆ-BABIĆ, I. LUCILLA, A. QUEROL and E. BARRIO. A comparative study of the wine fermentation performance of *Saccharomyces paradoxus* under different nitrogen concentrations and glucose/fructose ratios. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, vol. 108, issue 1, p. 73-80. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04406.x. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19566722>

- [57] KOWALLIK, V., E. MILLER and D. GREIG. The interaction of *Saccharomyces paradoxus* with its natural competitors on oak bark. *Molecular Ecology*, 2015, vol. 24, issue 7, p. 1596-1610. DOI: 10.1111/mec.13120.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25706044>
- [58] ENGEL, S. R., F. S. DIETRICH, D. G. FISK, et al. The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2014, vol. 4, issue 3, p. 389-398. DOI: 10.1534/g3.113.008995.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962479/>
- [59] HUANG, B., J. GUO, B. YI, X. YU, L. SUN and W. CHEN. Heterologous production of secondary metabolites as pharmaceuticals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2008, vol. 30, issue 7, p. 1121-1137. DOI: 10.1007/s10529-008-9663-z.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-008-9663-z>
- [60] HUI, Y. H., L. MEUNIER-GODDIK, A. S. HANSEN, J. JOSEPHEN, W.-K. NIP, P. S. STANFIELD and F. TOLDRÁ, ed. *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. New York: Marcel Dekker, 2004, 1000 p. ISBN 0-8247-4780-1.
- [61] OSIEWACZ, H. D., ed. *The Mycota: A comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research: X Industrial Applications*. Berlin: Springer-Verlag, 2001, 414 p. ISBN 978-3540415831.
- [62] BLACKBURN, C. de W., ed. *Food Spoilage Microorganisms*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006, 736 p. ISBN 978-1-85573-966-6.
- [63] INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE. *Dictionary of food science and technology*. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2009, 488 s. ISBN 14-051-8740-9.
- [64] ALBERTIN, W., CHASSERIAUD, L. and G. COMTE. Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast *Torulaspota delbrueckii*. *PLoS ONE*. 2014, vol. 9, issue 4, DOI: 10.1371/journal.pone.0094246.  
Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094246>
- [65] *TORULASPORA DELBRUECKII (Lindner) Lindner. Miniatlas Mikroorganismů* [online]. VŠCHT, 2006 [cit. 2017-02-22].  
Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm>
- [66] *Torulaspota delbrueckii. Search on: Yeast species* [online]. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2017 [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: <http://www.westerdijk.nl/collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeasts%20species&Name=Pichia%20jadinii&Fields=All&ExactMatch=T>
- [67] CAPPELLI, A., U. ULISSI, M. VALZANO, et al. A *Wickerhamomyces anomalus* Killer Strain in the Malaria Vector *Anopheles stephensi*. *PLoS One*, 2014, vol. 9, issue 5. DOI: 10.1371/journal.pone.0095988.  
Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095988>
- [68] CODA, R., RIZZELLO, C. G., DI CAGNO, R., TRANI, A., CARDINALI, G. and M. GOBBETTI. Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: Identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiology*. 2013, vol. 3, issue 2, s. 243-251. DOI: 10.1016/j.fm.2012.09.023. ISSN 0740-0020.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002012002158>

- [69] STRATFORD, M., H. STEELS, G. NEBE-VON-CARON, M. NOVODVORSKA, K. HAYER and D. B. ARCHER. Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, vol. 166, issue 1, p. 126-134. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160513003164>
- [70] PATRIGNANI, F., L. VANNINI, S. L. S. KAMDEM, R. LANCIOTTI and M. E. GUERZONI. Potentialities of High-Pressure Homogenization to Inactivate *Zygosaccharomyces bailii* in Fruit Juices. *Journal of Food Science*, 2010, vol. 75, issue 2, p. 116-120. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01508.x. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492240>
- [71] EMAMI, K., NELSON, A., HACK, E., ZHANG, J., GREEN D. H., CALDWELL G. S. and E. MESBAHI. MALDI-TOF Mass Spectrometry Discriminates Known Species and Marine Environmental Isolates of *Pseudoalteromonas*. *Frontiers in Microbiology*. 2016, vol. 7, article 104. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00104. ISSN 1664-302x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00104/abstract>
- [72] GEKENIDIS, M.-T., STUDER, P., WUTHRICH, S., BRUNISHOLZ R. a D. DRISSNER. Beyond the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Biotyping Workflow: in Search of Microorganism-Specific Tryptic Peptides Enabling Discrimination of Subspecies. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, vol. 80, issue 14, p. 4234-4241. DOI: 10.1128/AEM.00740-14. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00740-14>
- [73] *Literature room: Pharmaceutical Microbiology, MALDI Biotyper*<sup>®</sup> [online]. Bruker, 2014 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: [https://www.bruker.com/fileadmin/user\\_upload/8-PDF-Docs/Separations\\_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1841293\\_MBT\\_Pharma\\_brochure\\_12-2015\\_eBook.pdf](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1841293_MBT_Pharma_brochure_12-2015_eBook.pdf)
- [74] POSTERARO, B., DE CAROLIS, E., VELLA, A. and M. SANGUINETTI. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Review of Proteomics*. 2014, vol. 10, issue 2, p. 151-164. DOI: 10.1586/epr.13.8. ISSN 1478-9450. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/epr.13.8>
- [75] BRUKER DALTONIK GMBH. MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2. February 2011.
- [76] PAVLOVIC, M., HUBER, I., KONRAD, R. and U. BUSH. Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *The Open Microbiology Journal*, 2013, vol. 7, p. 135-141. DOI: 10.2174/1874285801307010135. ISSN 1874-2858. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3866695/>
- [77] Analytix Newsletter – Advances in Analytical Chemistry: MALDI-Mass Spectrometry, vol. 6 [online]. Sigma-Aldrich, 2001 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: [http://www.niu.edu/analyticallab/\\_pdf/maldi/fl-analytix6-2001.pdf](http://www.niu.edu/analyticallab/_pdf/maldi/fl-analytix6-2001.pdf)
- [78] BARNER-KOWOLLIK, C., GRUENDLING, T., FALKENHAGEN, J. and S. WEIDNER, ed. Mass spectrometry in polymer chemistry. Weinheim: Wiley-VCH, 2011, 500 p. ISBN 978-3-527-32924-3.

- [79] DREISEWERD, K. Recent methodological advances in MALDI mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014, vol. 406, issue 9, s. 2261-2278. DOI: 10.1007/s00216-014-7646-6. ISSN 1618-2650.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-014-7646-6>
- [80] PETER-KATALINIĆ, J. and F. HILLENKAMP ed. *MALDI MS: A Practical guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2007, 430 p. ISBN 978-352-7314-409.
- [81] LI, L.. *MALDI mass spectrometry for synthetic polymer analysis*. Hoboken, N. J.: Wiley, 2010, 299 p. ISBN 04-717-7579-7.
- [82] GHOSH, P. K. *Introduction to protein mass spectrometry*. Londýn: Academic Press, 2016, 312 p. ISBN 978-0-12-805123-8.
- [83] ČÁSLAVSKÝ, J. a J. G. K. ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" modul K02-2014*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014, 430 s. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [84] LÖÖKE, M., K. KRISTJUHAN and A. KRISTJUHAN. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 2011, vol. 50, issue 5, p. 325-328. DOI: 10.2144/000113672.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21548894>
- [85] XIAO, W., ed. *Yeast Protocols*. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2006, 392 p., eISBN 1-59259-958-3.
- [86] SPENCER, J. F. T., D. M. SPENCER and A. SMITH, ed. *Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects*. New York: Springer-Verlag, 1983, 533 p. ISBN 978-1-4612-5493-5.
- [87] VAN PELT-VERKUIL, E., A. VAN BELKUM and J. P. HAYS. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Science + Business Media B. V., 2008, 330 p. ISBN 978-1-4020-6240-7.
- [88] AAMIR, S., S. SUTAR, S. K. SINGH and A. BAGHELA. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. *Plant Pathology & Quarantine*, 2015, vol. 5, issue 2, p. 74-81. DOI: 10.5943/ppq/5/2/6.  
Dostupné z: [http://www.plantpathologyquarantine.org/pdf/PPQ\\_5\\_2\\_6.pdf](http://www.plantpathologyquarantine.org/pdf/PPQ_5_2_6.pdf)
- [89] CHI, M.-H., S.-Y. PARK and Y.-H. LEE, A Quick and Safe Method for Fungal DNA Extraction. *The Plant Pathology Journal*, 2009, vol. 25, issue 1, p. 108-111.  
DOI: 10.5423/PPJ.2009.25.1.108.  
Dostupné z: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=E1PPBG>
- [90] LIU, D., ed. *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*. Boca Raton: CRC Press, 2011, 1278 p. ISBN 978-1-4398-1238-9.
- [91] *Probe: Polymerase Chain Reaction (PCR)* [online]. NCBI: National Center for Biotechnology Information, 2014 [cit. 2017-02-22].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- [92] ERLICH, H. A., ed. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. London: Palgrave Macmillan, 1989, 246 p. ISBN 978-0-333-48948-2.
- [93] FITZGERALD-HAYES, M. and F. REICHSMAN. *DNA and Biotechnology*. 3rd ed. Academic Press, 2009, 400 p. ISBN 978-0-12-048930-5.

- [94] NOLAN, T. and S. A. BUSTIN. *PCR Technology: Current Innovations*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2013, 457 p. ISBN 978-1-4398-4805-0.
- [95] BROWN, T. A. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. 7th ed. Wiley-Blackwell, 2016, 376 p. ISBN 978-1-119-07256-0
- [96] IANNONE, E. *Labs on Chip: Principles, Design and Technology*. Boca Raton: CRC Press, 2015, 1178 p. ISBN 978-1-4665-6073-4.
- [97] LEE, P. Y., J. COSTUMBRADO, C.-Y. HSU and Y. H. KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 2012, issue 62, e3923. DOI: 10.3791/3923.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846332/>
- [98] HARTL, D. L. and E. W. JONES. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. 7th ed. Sudbury: Jones & Bartlett Publishers, 2009, 763 p. ISBN 978-0-7637-5868-4.
- [99] WINK, M., ed. *An Introduction to Molecular Biotechnology*. Weinheim: Wiley-WCH Verlag, 2006, 768 p. ISBN 978-3-527-31412-6.
- [100] ROSA, C. A. and P. GÁBOR, ed. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Berlin: Springer-Verlag, 2006, 580 p. ISBN 978-3-540-26100-1.
- [101] KURTZMAN, C. P. and C. J. ROBNETT. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, vol. 73, issue 4, p. 331-371. DOI: 10.1023/A:1001761008817.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1001761008817>
- [102] *Yeast molecular taxonomy: D1/D2 Diagram* [online]. StudyBlue, 2017 [cit. 2017-02-23].  
Dostupné z: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/yeast-molecular-taxonomy/deck/9823159>
- [103] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Yeasts and yeast-like organisms*. Weinheim: VCH, 1990, 528 s. ISBN 35-272-6162-1.
- [104] BOULTON, C. and D. QUAIN. *Brewing Yeast and Fermentation*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2006, 660 p. ISBN 978-1-4051-5268-6.
- [105] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A. *Katalóg kultúr kvasinek/Catalogue of yeast cultures*. Bratislava: Veda, 1977, 320 s. ISBN 71-033-77
- [106] KAVANAGH, K. *Fungi: biology and applications*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2011, 366 p. ISBN 978-047-0977-095.
- [107] VERSALOVIC, J., K. C. CARROLL, G. FUNKE, J. H. JORGENSEN, M. L. LANDRY and D. W. WARNOCK, ed. *Manual of Clinical Microbiology: Volume 2*. 10th ed. Washington: ASM Press, 2011, 2630 p. ISBN 978-1-55581-678-0.
- [108] Urea hydrolysis/ Urease test (Christensen's method). *Microbiology and Infectious Diseases: An educational site for student pursuing B.Sc and M.Sc. Medical Microbiology, MBBS, Nursing and Health Sciences* [online]. 2017 [cit. 2017-02-24].  
Dostupné z: <http://microbesinfo.com/2013/05/urea-hydrolysis-urease-test-christensens-method/>
- [109] ROBERTS, G. D., C. D. HORSTMEIER, G. A. LAND a J. H. FOXWORTH. Rapid urea broth test for yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 1978, vol. 7, issue 6, p. 584-588.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC275077/>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CCY	Sbírka kultur kvasinek
CHCA	Kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová
ČR	Česká republika
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
dCTP	Deoxycytosintrifosfát
ddNTPs	Dideoxynukleotidtrifosfáty
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dTTP	Deoxythymidintrifosfát
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
FA	Ferulová kyselina
GRAS	Obecně považován za nezávadný
IMA	Mezinárodní mykologická asociace
ITS1, 2	Vnitřní transkribovaný mezerník
LP-MID	Lineárně pozitivní mód
LSU rRNA	Velká podjednotka ribozomální ribonukleové kyseliny
MALDI-TOF	Desorpce a ionizace laserem za účasti matrice s průletovým analyzátozem
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
nDNA	Jaderná deoxyribonukleová kyselina
PCR	Polymerázová řetězová reakce
QPS	Kvalifikovaná presumpce bezpečnosti
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
RNAP	RNA polymeráza
SA	Sinapová kyselina
SAFA	Směs kyseliny sinapové a ferulové
SCP	Single cell protein
SDS	Dodecylsírán sodný
SK	Slovenská republika
SRN	Spolková republika Německo
ssDNA	Jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
SSU rRNA	Malá podjednotka ribozomální ribonukleové kyseliny
USA	Spojené státy americké
UV	Ultrafialové záření
YPD	Kultivační médium pro kvasinky s obsahem peptonu a dextrózy