

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Zemědělská fakulta**

**Katedra speciální produkce rostlinné**

Studijní program: B4131 - Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie - Živočišné

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Studium vlivu způsobu uchovávání kmenů kvasinek  
používaných v potravinářství na jejich genetickou stabilitu**

Autor bakalářské práce: **Anna Tkadlecová**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Pavel Beran, Ph.D.**

Konzultant: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

**České Budějovice 2017**

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Anna TKADLECOVÁ**

Osobní číslo: **Z14218**

Studijní program: **B4131 Zemědělství**

Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie - Živočišné**

Název tématu: **Studium vlivu způsobu uchovávání kmenů kvasinek  
používaných v potravinářství na jejich genetickou stabilitu**

Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Úvod: cílem práce je vyhodnocení rozdílných metod kultivace a uchovávání kvasinkových kultur na genetickou stabilitu kultury.

Cíle práce: definice hypotéz a cílů práce.

Literární přehled: taxonomické zařazení a popis kvasinek využívaných v potravinářství, mikrobiologická kontrola a determinace kvasinek, metody DNA fingerprintingu a jejich využití v determinaci mikroorganismů.

Materiál a metody: popis a charakteristika studovaných kmenů kvasinek, metodika kultivace a dlouhodobého uchovávání kultur, izolace DNA a analýzy molekulárních markerů.

Výsledky: vyhodnocení profilů molekulárních markerů, výsledky analýz molekulárních markerů, vyhodnocení elektroforetických dat, vyhodnocení stability DNA profilů v závislosti na způsobu uchovávání kultury, uspořádání do tabulek, grafů, vyhodnocení a statistické zpracování výsledků.

Diskuze: porovnání vlastních výsledků s literárními zdroji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce, doporučení vyplývajících z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním pořadí dle platné citační normy ČSN ISO 690 (01 0197).

Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací: 5-10 stran  
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná  
Seznam odborné literatury:


**Gustavo Caetano-Anollés, Peter M. Gresshoff (1997): DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. - John Wiley & Sons, Inc., New York.**  
**Avise J.C. (2004): Molecular Markers, Natural History, and Evolution. - Sinauer Associates, London.**  
**Weising K. et al. (2005): DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. - CRC Press, Boca Raton, USA.**  
**Lasztity R. (2009): Food Microbiology, Oxford, Eolss Publ.**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Pavel Beran, Ph.D.**  
Katedra speciální produkce rostlinné  
Konzultant bakalářské práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**  
Katedra speciální produkce rostlinné  
Datum zadání bakalářské práce: **8. března 2016**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2017**

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA   
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 1898, 370 05 České Budějovice

L.S.

  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 8. března 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2.4.2017

.....

Anna Tkadlecová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Pavlu Beranovi, Ph.D za odborné vedení při vypracování práce.

Dále bych chtěla poděkovat prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D za cenné rady. Za pomoc v laboratoři v době nepřítomnosti vedoucího práce děkuji především Ing. Ireně Jelínkové a Ing. Evě Jozové.

Děkuji také svým blízkým a rodině za trpělivost a cennou podporu během celého studia.

## **Anotace**

Cílem této práce je zhodnotit genetickou stabilitu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* během uchovávání v různých podmínkách. Tato kvasinka je využívána v mnoha odvětvích potravinářského průmyslu a její stálost je důležitá pro udržení stabilního výrobního procesu. Studie byla založena na DNA analýze ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) sekvencí, testování vhodných ISSR primerů a sekvenování ITS regionu *S. cerevisiae*.

### **Klíčová slova:**

Kvasinky, DNA fingerprinting, determinace, ISSR, *Saccharomyces cerevisiae*

## **Abstract**

The aim of this work is to evaluate genetic stability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during the storing in different conditions. This yeast is used in many areas of food industry. Its stability is important for preservation of stable manufacturing process. The study was based on a DNA analysis of ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) regions, testing of suitable ISSR primers and ITS region sequencing of *S. cerevisiae*.

### **Key words:**

Yeasts, DNA fingerprinting, determination, ISSR, *Saccharomyces cerevisiae*

## **Seznam zkratek**

AFLP – polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

bp – baze (*base*)

BSA – hovězí sérový albumin (*bovine serum albumine*)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)

dNTPs – volné deoxyribonukleotidy (*Nucleoside triphosphates*)

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina (*diethylenediaminetetraacetic acid*)

GRAS – *Generally Recognized As Safe*

ISSR - *Inter Simple Sequence Repeats*

ITS - *Internal Transcribed Spacer*

kb – kilobaze = 1000 bází (*kilobase*)

KTJ = kolonie tvořící jednotka (také CFU = *Colony forming unit*)

PCR – polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)

RAPD – náhodná amplifikace polymorfní DNA (*Random Amplification of Polymorphic DNA*)

RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

SSR – *Single Sequence Repeat*

TBE – tris borát EDTA pufr (*Tris/Borate/EDTA buffer*)

T<sub>m</sub> – teplota annealingu (*melting temperature*)

## **OBSAH**

OBSAH .....	8
1. ÚVOD .....	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	11
2.1 Taxonomie .....	11
2.2 Kvasinky využívané v potravinářství .....	11
2.2.1 Ascomycetes .....	11
2.2.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
2.2.1.2 <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	13
2.2.1.3 <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	14
2.2.1.4 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	15
2.2.1.5 <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	16
2.2.1.6 Ostatní potravinářské kvasinky .....	16
2.2.2 Basidiomycetes .....	17
2.2.2.1 <i>Rhodotorula glutinis</i> .....	17
2.3 Determinace kvasinek .....	18
2.3.1 Morfologické vlastnosti .....	18
2.3.2 Fyziologické a biofyzikální vlastnosti .....	19
2.3.3 Metody DNA fingerprintingu .....	20
2.3.3.1 PCR .....	20
2.3.3.2 RFLP .....	23
2.3.3.3 AFLP .....	24
2.3.3.4 Analýza mikrosatelitů .....	26
2.3.3.5 ISSR – PCR .....	27
2.3.3.6 Sekvenování DNA .....	28
2.3.3.7 Elektroforéza .....	28
3. CÍLE PRÁCE .....	30



4. MATERIÁL A METODY .....	31
4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a kultivační podmínky.....	31
4.3 Izolace DNA z kvasinek.....	32
4.4 ISSR – PCR.....	32
4.5 Elektroforéza .....	33
4.6. Sekvenování regionu ITS.....	34
5. VÝSLEDKY .....	35
6. DISKUZE.....	39
7. ZÁVĚR .....	41
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	42

## 1. ÚVOD

Mikroorganismy, a především kvasinky, byly pro různé výrobní procesy využívány již od dob neolitu. S jejich pomocí se lidé naučili vyrábět pivo, víno, chléb či některé výrobky z mléka. S postupem času a rostoucí industrializací bylo zapotřebí mít kontrolu nad požadovaným kmenem kvasinek a sledovat jeho případné změny, aby byla zajištěna stálost daného výrobku. K tomuto účelu se začala využívat determinace kvasinek. Kvasinky se dají rozlišit na základě tradičních metod dle morfologických, fyziologických či biofyzikálních vlastností. S příchodem technik molekulární biologie se do popředí determinace dostaly metody tzv. DNA fingerprintingu, které jsou oproti tradičním metodám rychlejší a přesnější.

Jedním z cílů této práce je shrnutí nejčastějších kmenů kvasinek využívaných v potravinářství a jejich determinaci tradičními i moderními metodami. Hlavním cílem této práce je zjištění genetické stability potravinářsky nejvyužívanější kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pomocí analýzy mezimikrosatelitních lokusů ISSR-PCR.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Taxonomie

Kvasinky řadíme do domény Eukaryota, říše houby (Fungi). Jednotnou taxonomickou skupinu netvoří. Dle způsobu pohlavního rozmnožování je dále řadíme mezi Ascomycety (vřeckovýtrusné houby), případně mezi Basidiomycety (stopkovýtrusné houby). Kvasinky, které se rozmnožují pohlavně, nazýváme teleomorfní kvasinky. Mezi anamorfní formy jedné nebo druhé skupiny kvasinek řadíme ty, u kterých nebylo pohlavní rozmnožování prokázáno. Ty nazýváme Deuteromycotina. Deuteromycotina je pomocné pododdělení spadající k oddělení Ascomycota. Dříve byly označovány jako „nepravé kvasinky“, jelikož jsou nedokonalými stádii perfektních druhů (Janderová, Bendová, 1999; Šilhánková, 2002).

### 2.2 Kvasinky využívané v potravinářství

Kvasinky jsou jednobuněčné, heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, jejichž název je odvozen od schopnosti většiny kvasinek zkvašovat monosacharidy, disacharidy a trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý (Šilhánková, 2002).

Poprvé byly pozorovány v roce 1680 A. van Leeuwenhoekem. O 200 let později byly využity Louisem Pasteurem ke studiu alkoholové fermentace v pivu a vínu, který potvrdil jejich účast na kvasném procesu. V 80. letech 19. století izoloval E. Ch. Hansen první čisté kultury *Saccharomyces cerevisiae* z vína (Feldmann, 2011; Janderová, Bendová, 1999).

Kvasinky jsou mikroorganismy v potravinářství zcela nepostradatelné. Využívají se v pivovarství, vinařství, pekárenství, lihovarství, k výrobě kyseliny citronové, produkce biomasy a dále. Mimo potravinářství nalézají uplatnění ve výzkumu a genovém inženýrství, kde slouží jako eukaryotní modelový organismus (především *S. cerevisiae* a *S. pombe*) (Kopecká a kol., 2012; Šilhánková, 2002).

#### 2.2.1 Ascomycetes

Mezi Ascomycetes řadíme kvasinky dělicí se přehrádkami a kvasinkovité organismy s pravým myceliem, dále jednobuněčné pučící kvasinky a anamorfní formy askogenních kvasinek (Janderová, Bendová, 1999). Ascomycetes jsou schopny vytvářet endospory. Pučí holoblasticky. Až na výjimky neprodukují ureázu,

mají schopnost zkvašovat sacharidy. Buněčná stěna je nepigmentovaná, trojvrstvá. Převládá v ní glukán a manan (Kocková - Kratochvílová, 1990).

### **2.2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* je nejpoužívanější a zároveň nejprostudovanější kvasinkou v potravinářství a dalších biotechnologiích a slouží rovněž jako modelový eukaryotní organismus (Kurtzman a kol., 2011). Kvasinky rodu *Saccharomyces* jsou schopny zkvašovat glukosu, sacharosu, maltosu, galaktosu a rovněž trisacharid rafinosu, naopak nezakvašují laktózu (Šilhánková, 2002). Využití nachází především v pivovarství, vinařství, lihovarství a pekárenství (Krescanková a kol., 2015).

V pivovarství se kvasinky dělí na spodní a svrchní. Mezi spodní pivovarské kvasinky řadíme druh *Saccharomyces pastorianus* (dříve označován jako *S. carlsbergensis*), hybrid druhů *S. cerevisiae* a *S. eubayanus* (Gibson, Liti, 2015). Využívají se k výrobě ležáků při teplotě 7 – 15°C a jejich sedimentace probíhá u dna kvasné nádoby (Basařová a kol., 2010). Jsou schopny fermentovat sacharid melobiosu (Krescanková a kol., 2015). Svrchní pivovarské kvasinky se využívají k výrobě pšeničných piv, piv typu ale apod. Řadíme mezi ně druh *S. cerevisiae*. Tyto kvasinky fermentují sacharidy při 18-24°C a narozdíl od spodních kvasinek nezakvašují melobiosu (Lodolo a kol., 2008). Často se vyskytuje vynášení kvasnic do tzv. kvasničné deky (Basařová a kol., 2010).

Ve vinařství se uplatňuje hned několik druhů kvasinek. Dříve bylo využíváno tzv. spontánního kvašení, které zahájily kvasinky přirozeně přítomné na bobulích révy vinné. V průmyslové výrobě se využívají především čisté vinařské kultury druhů *S. cerevisiae* a *S. bayanus*. *S. cerevisiae* se díky její tolerantnosti k vyššímu obsahu alkoholu projevuje až v závěrečné fázi fermentace. (Pretorius, 2000). Při výrobě perlivých vín či sektů se využívá tzv. sekundární fermentace, která probíhá v lahvích. Využívá se rovněž směsi vinných kvasinek *S. cerevisiae* a *S. bayanus*. Kvasinky při dlouhodobém zrání sektu podléhají autolýze za současného vzniku aromatických frakcí (Perpetuini a kol., 2016).

V lihovarství se rovněž nejvíce používá kvasinka *S. cerevisiae*, v některých zemích je známo i využití kvasinky *S. uvarum* (Ivanova a kol., 1989). Typická vlastnost lihovarského kmene kvasinky *S. cerevisiae* je vysoká odolnost vůči obsahu

ethanolu, vysoká rychlost fermentace a vysoký výtěžek na jednotku spotřebovaného materiálu (Krescanková a kol., 2015).

*S. cerevisiae* je mimo výše zmíněných odvětvích hojně využívána i v pekárenství k výrobě kynutého pečiva. Její pekárenské kmeny jsou schopné odolávat stresujícím faktorům, jako jsou např. bakterie mléčného kvašení a s tím související nízké pH, nízký obsah kyslíku adalší. Mimo této dominantní kvasinky se uplatňují i jiné druhy kvasinek, které jsou specifické pro danou oblast (De Vuyst a kol., 2016).

### **2.2.1.2 *Debaryomyces hansenii***

*Debaryomyces hansenii* je osmo-, halo- a xerotolerantní, nepatogenní kvasinka s vysokým biotechnologickým potenciálem. Vzhledem k její schopnosti produkce a hromadění velkého množství lipidů se rovněž označuje jako tzv. olejnatá kvasinka. Vyznačuje se tolerancí k velmi vysoké koncentraci soli, zároveň ale i k biocidu oxidu chloričitému, vysokou rezistencí k antimikrobiálnímu činidlu penconazole a střední rezistencí k antimikrobiálním činidlům cykloheximidu a benomyly (Breuer, Harms, 2006).

*D. hansenii* je schopna asimilovat melobiózu a rozpustný škrob. Glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu a rafinózu fermentuje velmi slabě, laktózu nezkvašuje. V přítomnosti D-glukózy metabolicky oxiduje naftalen a benzopyren (Breuer, Harms, 2006).

Kvasinka se vyskytuje v prostředí s nízkou aktivitou vody, např. v sýrech a mase, objevena byla rovněž v mořské vodě. Osidluje i produkty s vysokou koncentrací glukózy, její výskyt byl prokázán v pivu, vínu nebo ovoci (Bubnová a kol., 2014; Breuer, Harms, 2016).

V potravinářství má *D. hansenii* široké využití. V mlékárenském průmyslu je součástí některých startovacích kultur tvrdých i měkkých sýrů a její metabolická aktivita se výrazně podílí na jejich zrání. Vzhledem k výraznému tzv. killer efektu, omezuje růst nežádoucích mikroorganismů (Prista a kol., 2016). Přítomnost *D. hansenii* je žádoucí rovněž ve fermentovaných klobásách a salámech. Kromě lipolytické aktivity a schopnosti zachytávat kyslík může také oddálit žluknutí a odbourávat produkty kvašení (např. laktát) na vedlejší produkty. Zvýšené pH dává

výrobkům charakteristickou chutí a barvu (Cano – García a kol., 2013). *Debaryomyces hansenii* se díky vysoké produkci lytických enzymů využívá v pivovarství a vinařství k odstranění zákalu způsobeného bílkovinami (Breuer, Harms, 2006). V zemědělství se využívá jako tzv. biocontrol agent pro indikaci posklizňových chorob, např. zelené a modré plísně a hniloby u citrusů, šedé plísně a hniloby způsobené plísní *Rhizopus* u hroznů révy vinné a rajčat (Sharma a kol., 2009). *D. hansenii* se dále využívá pro produkci xylitolu, přírodního sladidla pro diabetiky (Sampaio a kol., 2007).

### **2.2.1.3 *Kluyveromyces lactis***

*Kluyveromyces lactis* je tzv. nekonvenční, důležitá non – *Saccharomyces* kvasinka s vysokým potenciálem pro biotechnologický a potravinářský průmysl (Rodicio, Heinisch, 2013; Spohner a kol., 2016).

I přes společné předky s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* se jejich metabolismus velmi liší. Narozdíl od *S. cerevisiae*, jejímž hlavním metabolismem je alkoholová fermentace, je metabolismus *K. lactis* respiratorní (Rodicio, Heinisch, 2013; Rubio – Texeira, 2005). *K. lactis* dokáže využívat laktózu jako hlavní zdroj uhlíku a energie. Její schopnost asimilovat laktózu závisí na genech *LAC12* a *LAC4*, které umožňují hydrolýzu laktózy na galaktózu a glukózu (Rubio – Texeira, 2005).

*Kluyveromyces lactis* se používá v mlékárenském průmyslu a dále při výrobě heterologních proteinů. Je tradiční využívána při výrobě sýrů, jogurtů a dalších fermentovaných mléčných produktů, především kefiru. Její výskyt byl prokázán i v másle a sýrech typu camembert (Rubio – Texeira, 2005; Spohner a kol., 2016). *K. lactis* je označována jako GRAS (generally recognized as safe), díky tomu je velmi atraktivním mikroorganismem v potravinářském průmyslu. Velmi významná je její schopnost produkovat enzym  $\beta$  – galaktosidázu, který se z ní izoluje. Enzym je také znám pod pojmem laktáza. Tento enzym je schopen hydrolyzovat laktózu, která často vyvolává laktózovou intoleranci u lidí, na stravitelnější glukózu a galaktózu. Transglykosylační aktivita  $\beta$  – galaktosidázy může být využita k výrobě galaktooligosacharidů, neboli prebiotik. Rovněž jsou využívána jako nízkokalorická sladidla (Rodicio, Heinisch, 2013; Spohner a kol., 2016). Panesar a kol. (2006) tvrdí, že sýr z mléka hydrolyzovaného tímto enzymem, zraje rychleji, než sýr z mléka bez přídavku  $\beta$  – galaktosidázy.

*Kluyveromyces lactis* se využívá také jako hostitelský organismus pro produkci heterologních proteinů, např. chymozinu, který se používá jako syřidlo. Dříve byl izolován z telecích brzlíků (Rodicio, Heinisch, 2013). Spohner a kol. (2016) uvádí jako další využití *K. lactis* produkci některých metabolitů, např. laktátu nebo D – arabitolu vyráběného ze syrovátky. Šandula a kol. (1984) tuto kvasinku použil ve svém výzkumu, který se zabýval produkcí biomasy bílkovin ze syrovátky. Ta byla dále využívána ke krmivářským účelům.

#### **2.2.1.4 *Torulaspóra delbrueckii***

*Torulaspóra delbrueckii* je non-*Saccharomyces* kvasinka, která se přirozeně vyskytuje ve vínu, pivu, v ovocných šťávách, v půdě či na rostlinách (Kochláňová a kol., 2016).

Největší uplatnění nachází *T. delbrueckii* ve vinařství. Využívána je spolu se *S. cerevisiae* k výrobě rozsáhlé škály vín, kterým dodává chuť a aroma. V bílém vínu tvoří především estery kyseliny octové, thioly a monoterpeny (Varela, Borneman, 2016). Aroma a chuť ve vínu vzniká díky schopnosti této kvasinky transformovat monoterpeny obsažené v révě vinné, mezi které patří např. nerol, geraniol,  $\alpha$ -terpineol, linalool či citronellol (King, Dickinson, 2000). Při výrobě červených vín má výrazný vliv na intenzitu barvy a utváření celkového dojmu. Uplatnění nachází i při výrobě šumivých vín (Varela, Borneman, 2016).

Opomenout nelze ani schopnost specifických kmenů *T. delbrueckii* produkovat tzv. „killer toxin“ označený jako TdKT. Killer toxiny této kvasinky mají nejširší spektrum působení na víno kazící kvasinky, mezi které patří např. *Brettanomyces* nebo *Dekkera*, a mohou tak sloužit jako potenciální biocontrol agent. (Villalba, 2015).

V pivovarství je spolu s některými dalšími non-*Saccharomyces* kvasinkami využívána k výrobě nízkoalkoholických piv (do 5 % objemu alkoholu). Některé kmeny *T. delbrueckii* nejsou schopny fermentovat maltózu a mají potenciál ve výrobě nealkoholických piv (do 1 % objemu alkoholu). Piva, která byla vyrobena pomocí této kvasinky, chutnají více po mladině a vyznačují se sladší a ovocnější chutí než piva klasická (Kochláňová a kol., 2016).

Varela a Borneman (2016) odkazují na použití *T. delbrueckii* i v pekařství při výrobě chleba. Chléb fermentovaný touto kvasinkou měl ve srovnání s chlebem vyrobeným za použití *S. cerevisiae* lepší sensorické vlastnosti.

#### **2.2.1.5 *Yarrowia lipolytica***

*Yarrowia lipolytica* je tzv. nekonvenční, nepatogenní, GRAS kvasinka vyskytující se v substrátech bohatých na lipidy i proteiny (Nicaud, 2012).

Tato kvasinka má široké spektrum uplatnění v potravinářství a velký biotechnologický potenciál. V mlékárenském průmyslu se může nacházet v sýrech či jogurtech, kde produkuje aromatické složky. Její značná proteolytická aktivita způsobuje hydrolýzu kaseinu, při které vznikají peptidy a volné aminokyseliny. Ty mají zvláštní význam při výrobě sýrů s modrou plísní, kde je *Y. lipolytica* spolu s plísní *Penicillium roqueforti* využívána. Lipázy a esterázy, které kvasinka produkuje, mají značný vliv na zrání sýrů. *Y. lipolytica* byla detekována i ve slovenské brynze, v sýru Pecorino, Camembert či v Goudě. V masném průmyslu se podílí na chuti a textuře suchých fermentovaných klobás (Zinjarde, 2014).

*Y. lipolytica* je využívána také k produkci potravinářských aditiv, především aromatických látek (např. broskvové aroma), organických kyselin, polyalkoholů, emulgátorů nebo povrchově aktivních látek (Liu a kol., 2015; Zinjarde, 2014). Jako substrát pro výrobu aditiv jsou používány různé zdroje uhlíku, např. glukóza, glycerol, alkoholy a další. Mezi nejčastěji využívané kyseliny v potravinářství patří kyselina citronová, kterou produkuje kmen *Y. lipolytica* ACA-YC 5033 z glycerolu. Stejný substrát využívají i kmeny *Y. lipolytica* LFMB 19 a LFMB 20 k produkci mannitolu, který se využívá jako umělé sladidlo (Liu a kol., 2015).

Mimo potravinářství má tato kvasinka velký význam i v chemickém průmyslu, v biotechnologiích, v produkci biopaliv a mnoho dalších (Sabirova a kol., 2011).

#### **2.2.1.6 Ostatní potravinářské kvasinky**

*Zygosaccharomyces rouxii* je využívána při výrobě sójové omáčky či fermentované sójové pasty miso. Její výskyt byl rovněž zaznamenán v počátečním stádiu výroby balsamického octa.



*Schizosaccharomyces pombe* je kvasinka, jejíž výskyt byl potvrzen ve fermentovaném čaji Kombucha, rovněž byla nalezena i v alkoholických nápojích. Využívá se při výrobě prosového piva „pombe“ v afrických pivovarech.

*Hanseniospora uvarum* se vyskytuje na počátku přirozené fermentace ovocných šťáv a vín, rovněž je přítomna během fermentace kávových zrn. Vzhledem ke schopnosti inhibovat růst plísně *Botrytis cinerea* je využívána ve vinařství jako biocontrol agent (Kurtzman a kol., 2011).

## **2.2.2 Basidiomycetes**

Mezi Basidiomycetes řadíme kvasinky se schopností tvorby exospor a dikaryonových mycelií. Sacharidy nezksašují, případně je zksašují ojedinele. Buněčná stěna je lamelární, v povrchových vrstvách často slizovitá a pigmentovaná. Převládá v ní chitin a manan (Janderová, Bendová, 1999; Kocková – Kratochvílová, 1990).

### **2.2.2.1 Rhodotorula glutinis**

*Rhodotorula glutinis* je pigmentovaná, olejnatá kvasinka, která je vzhledem ke své bezpečnosti a velkému biotechnologickému potenciálu zvláště důležitá pro potravinářský, krmivářský a případně farmaceutický průmysl. Její výskyt byl prokázán ve vzduchu či půdě, nalezena byla i v mléce a mléčných produktech, zejména v sýrech (Hernández-Almanza a kol., 2013; Yen a kol., 2014).

*Rhodotorula glutinis* je schopna produkovat velké množství přírodních pigmentů – karotenoidů. Nejvýznamějšími karotenoidy jsou  $\beta$ -caroten a astaxanthin, které se používají jako potravinářská barviva nebo jako přídavek do krmiv. Tyto látky jsou zároveň antioxidanty a prekurzory vitamínu A (Aksu, Eren, 2007). Kromě karotenoidů je významná z hlediska produkce lipidů, které vytváří ve formě triglyceridů. Takto vytvořené lipidy mohou být alternativou ropy, popřípadě mohou být použity jako materiál na výrobu bionafty. Mimo výše uvedeného je *R. glutinis* významná i díky schopnosti vysoké produkce single-cell protein, kyseliny octové a acetaldehydu (Hernández-Almanza a kol., 2013).

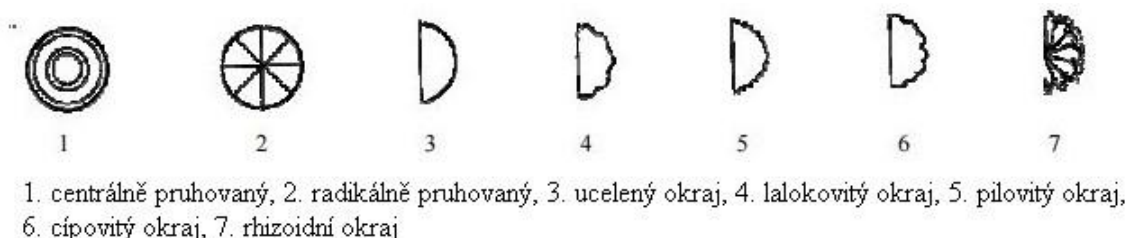
## 2.3 Determinace kvasinek

Determinace kvasinek je založena na tradičních metodách, které se zabývají zkoumáním morfologie, fyziologie a biochemických dějů daného mikroorganismu a metodách moderních, tzv. DNA-fingerprintingu (Augustová, 2010). Vzhledem k časové náročnosti determinace tradičními metodami a jejich nejednoznačnosti se v současnosti více používají metody DNA-fingerprintingu (Boulton, Quain, 2001).

### 2.3.1 Morfologické vlastnosti

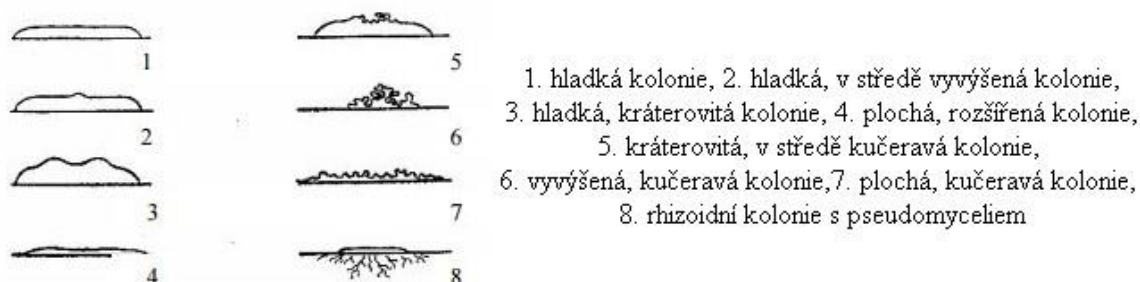
Určení morfologických vlastností kvasinek se provádí mikroskopem nebo přímým pozorováním. Tyto vlastnosti nejčastěji určujeme u kvasinek rostoucích na tuhých půdách, kde vytváří kolonie velmi variabilního vzhledu (Obr. 1, Obr. 2) v závislosti na mnoha faktorech, např. složení živné půdy nebo kultivačních podmínkách. Povrch kolonií může být různý v závislosti na druhu kvasinky, nejčastěji se však popisuje jako hladký, drsný, nebo slizovitý. U dimorfních kvasinek může být morfologie kolonií významně ovlivněna během přechodu z kvasinkové do pseudohyální formy (Kocková – Kratochvílová, 1982; Vopálenská a kol., 2005).

Obr. 1 – Typy povrchů a okrajů kolonií.



(Kocková – Kratochvílová, 1982, upraveno)

Obr. 2 – Různé typy průřezů koloniemi.



(Kocková – Kratochvílová, 1982, upraveno)

K pozorování morfologie jednotlivých buněk se používá výhradně mikroskop. Tvary kvasinkových buněk jsou velmi rozmanité, charakteristické pro každý druh a popřípadě rody (Obr. 3). Na tvar buněk rovněž působí vnější prostředí, např. složení živného média, koncentrace látek v něm, kyselost a další. Tvar mohou buňky kvasinek měnit i během vývoje. Za základní tvar kvasinkových buněk je považován rotační elipsoid, který se může měnit na kulaté a případně polodlouhé až vláknité tvary (Kocková – Kratochvílová, 1982).

Obr. 3 – Různé tvary kvasinkových buněk.



1. kulaté, 2. oválné, 3. citrónkovité, 4. ogivální, 5. lahvovité, 6. protáhlé, 7. vláknité

(Kocková – Kratochvílová, 1982, upraveno)

### 2.3.2 Fyziologické a biofyzikální vlastnosti

Mezi fyziologické vlastnosti se řadí mnoho aspektů, dle kterých jsou kvasinky determinovány. Jedním z nejdůležitějších je kultivační teplota. U mikroorganismů je sledována optimální teplota růstu, ale také minimální či maximální teplota, při které mikroorganismus ještě roste. Dalším z aspektů může být tvorba barviv, pozorování polysacharidových pouzder či sporulace. Z hlediska výživy je sledování zaměřeno na potřebu vitamínů, růst v přítomnosti jediného zdroje uhlíku či dusíku a především na schopnosti kvašení cukrů, která je u kvasinek základním znakem. Důležité je také zmínit vliv okolního prostředí na kvasinky, např. zvýšený osmotický tlak, vliv antibiotik či tolerance vůči ethanolu (Augustová, 2010).

Mezi biofyzikální pozorované vlastnosti se řadí např. sedimentační rychlost, elektroforetická pohyblivost či aktivita kvasinkových enzymů (Augustová, 2010).

### 2.3.3 Metody DNA fingerprintingu

DNA fingerprinting je soubor metod, které umožňují identifikovat organismus (popř. kmen a další) na základě polymorfismů sekvencí určitých úseků DNA. Uplatnění nachází především v taxonomii, fylogenezi, ekologii, genetice, šlechtitelství, ale i v medicíně či forenzní biologii (Kirby, 1990; Weising a kol., 1995).

Weising a kol. (1995) rozděluje detekci polymorfismů do 2 strategií:

1. DNA fingerprinting pomocí hybridizace, kdy je genomová DNA štěpena restriktčními enzymy a následně separována gelovou elektroforézou na jednotlivé fragmenty dle velikosti. Polymorfní lokusy jsou následně detekovány značenými komplementárními sekvencemi DNA, neboli sondami. Mezi tyto metody se řadí např. tzv. Southern blot.
2. DNA fingerprinting pomocí PCR, kdy dochází k *in vitro* amplifikaci konkrétního úseku DNA za pomoci specifických oligonukleotidů (neboli primerů) a termostabilní DNA polymerázy. Mezi tyto metody se řadí např. AFLP, SSR či ISSR – PCR.

#### 2.3.3.1 PCR

PCR, nebo-li polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je metoda molekulární biologie, kterou vyvinul Karry Mullis v roce 1983. Za tento objev mu byla v roce 1993 udělena Nobelova cena za chemii (Shafique, 2012).

Princip metody PCR je založen na amplifikaci genů a dalších úseků DNA *in vitro*, bez použití klonování a je obdobou replikace nukleových kyselin (Snustad, Simmons, 2009; Šmarda a kol., 2005). Vzhledem k rychlosti a jednoduchosti metody se PCR stala oblíbenou v mnoha vědeckých oborech, např. v molekulární biologii nebo mikrobiologii (Shafique, 2012).

Polymerázová řetězová reakce umožňuje specifickou a exponenciální syntézu nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' (Obr. 4). Tento proces probíhá cyklicky enzymatickou reakcí prostřednictvím DNA-polymerázy. Vybraný úsek DNA je vymezen specificky navrženými fragmenty DNA, tzv. primery. Ty definují úsek, který má být amplifikován. Primery se na protilehlé řetězce DNA vážou tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. Na primery

se následně vážou za pomoci DNA-polymerázy volné nukleotidy a syntéza nových vláken probíhá protisměrně na obou řetězcích (Pelt-Verkuil a kol., 2008; Šmarda a kol., 2005).

Aby mohla reakce správně probíhat, je zapotřebí, aby reakční směs obsahovala:

- Templátovou DNA
- Specifické primery (oligonukleotidy o velikosti 18-25 bp)
- Termostabilní DNA-polymerázu (nejčastěji *Taq* polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*)
- Volné deoxyribonukleotidy (dNTPs)
- Roztok pufru a další složky, např. hořčnaté či amonné ionty (Shafique, 2012; Šmarda a kol., 2005).

Metoda PCR je proces, při kterém dochází k pravidelnému střídání 3 kroků, které se opakují. Každý krok vyžaduje jinou teplotu a probíhají v nich odlišné děje:

1. Denaturace při teplotě 92-95 °C po dobu asi 30 sekund
2. Annealing při teplotě 50-65°C po dobu asi 30 sekund
3. Elongace při teplotě 70-72°C po dobu asi 1,5 minuty (Shafique, 2012; Snustad, Simmons, 2009; Weaver, 2005).

V prvním kroku dochází k zahřátí reakční směsi a následné denaturaci dvouvláknové molekuly DNA. Při annealingu se směs ochladí, což umožní nasednutí primerů na obě vlákna denaturované DNA. Teplota, při které probíhá annealing, se určuje podle bazí, ze kterých jsou primery složeny. V posledním kroku dochází k syntéze nových vláken pomocí DNA-polymerázy. Cyklus probíhá ve 20 až 30 opakováních. Po 30 amplifikačních cyklech vznikne více než miliarda kopií sekvence DNA (Harvey, Ferrier, 2011; Tropp, 2012). Někteří autoři uvádějí možnost použití vedlejšího kroku na začátku PCR, tzv. úvodní denaturace, která probíhá při 94°C po dobu asi 3 minut. Na konci programu PCR může být využita ještě závěrečná elongace při teplotě 72°C po dobu asi 7 minut.



Konečným produktem PRC jsou amplikony. Jedná se o fragmenty DNA definované délky o velikosti několika desítek až tisíc bp. Přítomnost amplikonů v reakční směsi lze prokázat stanovením jejich velikosti elektroforézou. K elektroforéze jsou nejčastěji využívány agarózové nebo polyakrylamidové gely. Zviditelnění DNA molekul pod UV světlem lze dosáhnout obarvením vhodným fluorescenčním barvivem, např. ethidium bromidem nebo SYBR Green. (Rao a kol., 2006; Šmarda a kol., 2005).

PCR je využívána v široké škále modifikací. Často se využívá tzv. mikrosatelitů (SSR – Simple Sequence Repeats), což jsou krátké, tandemové repetitivní sekvence DNA. Využití nachází např. v metodách SPAR (Single SSR Primer Amplification Reaction), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) nebo RAMP (Randomly Amplified Microsatellite Polymorphism) (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

### **2.3.3.2 RFLP**

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) neboli polymorfismus délky restrikčních fragmentů je molekulární marker, který popsal Botstein a kol. (1980). Tento marker je detekován restrikčními enzymy (neboli endonukleázami). Restrikční endonukleázy se vyskytují v řadě různých prokaryot a mají schopnost štěpit DNA ve specifických místech (tzv. restrikční místa) obvykle obsahujících 4-6 bazí uspořádaných do palindromů (Kirby, 1990; Srivastava a kol., 2004; Weising a kol., 1995). Podstatou RFLP jsou mutace, které vedou k vytvoření nebo ztrátě restrikčních míst pro endonukleázy, či vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí, inzercí, delecí nebo přestaveb ve specifických oblastech chromozomů (Šmarda a kol., 2005).

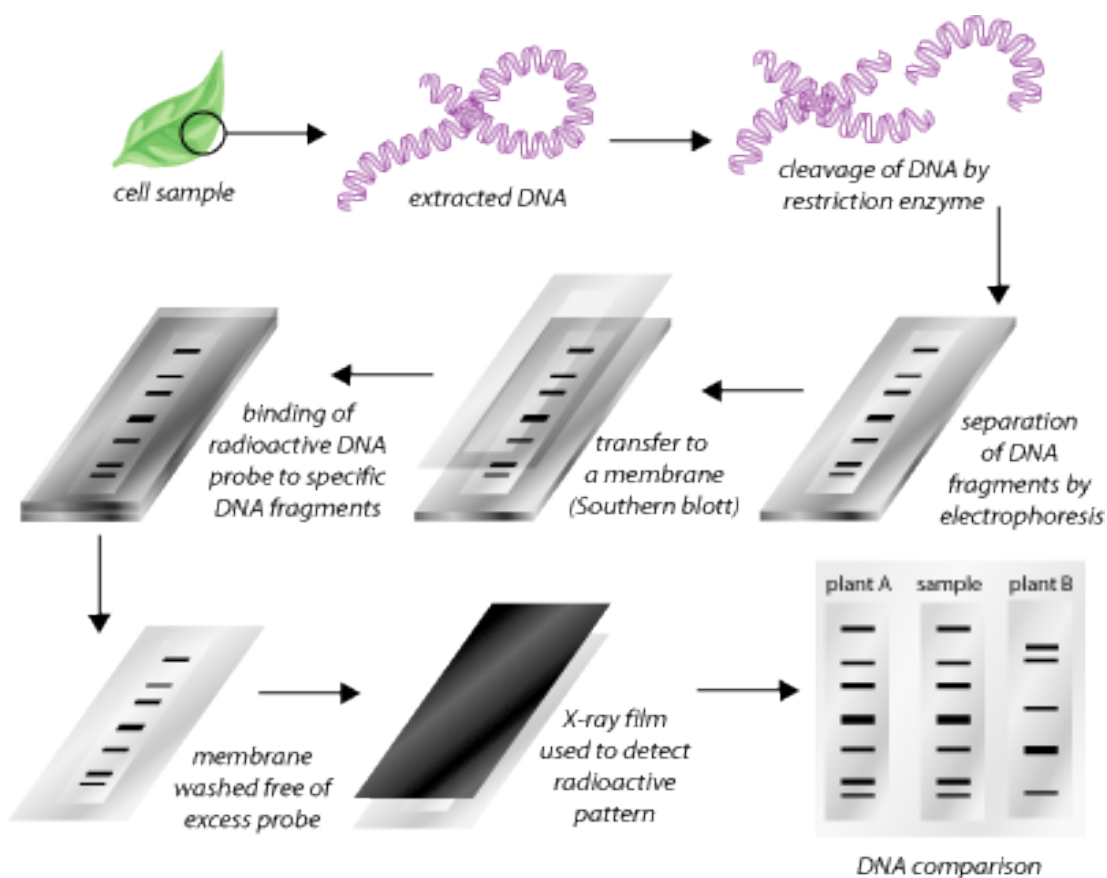
Restrikční analýza je založena na bázi hybridizace. Nejprve dochází ke štěpení genomové DNA endonukleázami ve specifických místech a následně k separaci fragmentů dle velikosti na gelové elektroforéze. Tyto rozdíly ve velikosti lze snadno detekovat. Gelová elektroforéza může být doplněna tzv. Southern blotem (Obr. 6) (Šmarda a kol., 2005; Weising a kol., 1995).

Southern blotting je technika, při které dochází k přenosu molekul DNA z elektroforetického gelu na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu. Na imobilizovanou DNA je následně hybridizována radioaktivně značená sonda

obsahující komplementární specifickou sekvenci. Membrána je následně přenesena na film a dochází k detekci radioaktivního záření sond (Brown, 2001).

RFLP nachází využití v genetickém mapování (Botstein a kol., 1980), studiu polymorfismu, forenzní biologii či v prenatální diagnostice a medicíně (Kirby, 1990). Tato metoda byla v determinaci kvasinek velmi úspěšná, avšak vzhledem ke své časové náročnosti a potřebě velkého množství kvalitní DNA od ní bylo v praktické determinaci víceméně ustoupeno (Boulton, Quain, 2001).

Obr. 6 – Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)



Zdroj: <http://www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/DNAfingerprintherbs/rflp.gif>

### 2.3.3.3 AFLP

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) neboli polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů je technika detekce polymorfismů, která reprezentuje kombinaci RFLP analýzy a PCR s výslednými vysoce informativními otisky DNA (Šmarda a kol., 2005; Weising a kol., 1995). Tuto metodu poprvé popsal

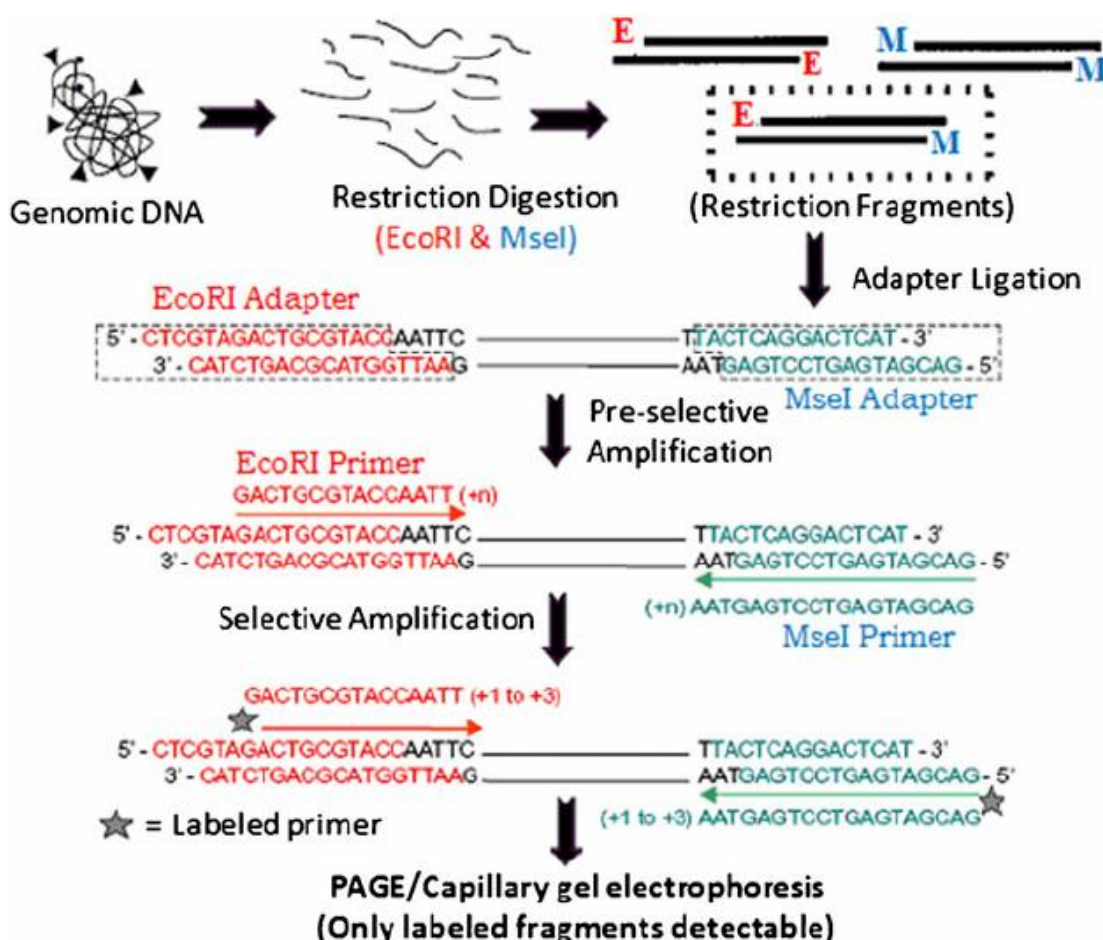


Vos a kol. (1995). AFLP je silný molekulární marker, který se využívá pro charakterizaci genomové DNA (Caetano-Anollés, 1997).

Prvním krokem metody AFLP je štěpení genomové DNA 2 restrikčními enzymy, přičemž jedna restrikτάza se vyznačuje průměrnou štěpící frekvencí (tvoří menší fragmenty) a druhá vyšší štěpící frekvencí (vytváří větší fragmenty) (Boulton, Quain, 2001). Následuje ligace adaptorů s definovanou sekvencí, které jsou ligovány na oba konce všech restrikčních fragmentů. Tyto oligonukleotidové adaptory jsou navrženy tak, aby nedocházelo k obnově restrikčního místa. Následně provedená PCR využívá speciálně designované AFLP-primery, které umožňují amplifikovat pouze podmnožinu restrikčních fragmentů. Dochází tak nejdříve k tzv. pre-selektivní amplifikaci a následně k tzv. selektivní amplifikaci. Metoda je zakončena gelovou elektroforézou amplifikovaných fragmentů v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu (Obr. 7) (Šmarda a kol., 2005; Vos a kol., 1995; Weising a kol., 1995). Tento polymorfismus je založen na získání nebo případné ztrátě restrikčních míst. Je analogický s polymorfismem RFLP (Šmarda a kol., 2005).

Jednoznačná výhoda AFLP analýzy vychází ze schopnosti rychle vytvářet velké množství markerových fragmentů z jakéhokoli organismu bez předchozí znalosti genomové sekvence. Mezi další výhody patří nízká potřeba výchozího templátu. Ve srovnání s jinými metodami DNA fingerprintingu (např. RAPD nebo ISSR) vykazuje metoda AFLP mnohem vyšší reprodukovatelnost (Paun, Schönswetter, 2012). Nevýhodou této metody je neschopnost rozeznat úzce příbuzné druhy, např. u skupiny *Saccharomyces sensu stricto* (Boulton, Quain, 2001).

Obr. 7 – Amplified Fragment Length Polymorphism



Zdroj:

[https://www.researchgate.net/profile/Awanish\\_Kumar3/publication/233957914/figure/fig1/AS:299952539488266@1448525666910/Fig-1-Schematic-representation-of-the-AFLP-technique-for-the-generation-of-molecular.png](https://www.researchgate.net/profile/Awanish_Kumar3/publication/233957914/figure/fig1/AS:299952539488266@1448525666910/Fig-1-Schematic-representation-of-the-AFLP-technique-for-the-generation-of-molecular.png)

### 2.3.3.4 Analýza mikrosatelitů

Mikrosatelity (SSR – Simple Sequence Repeat nebo STR – Short Tandem Repeat) jsou hypervariabilní, kodominantní, vysoce polymorfní molekulární markery přítomné v celém genomu. Jsou složeny z krátkých tandemových repetitivních jednotek z 1-6 bp. Tyto sekvence se mohou mnohokrát opakovat a tvořit tak řetězec o 20 až několika stech bp. Většina mikrosatelitů se nachází ve formě dinukleotidů (např. (AC)<sub>n</sub>), mohou ale tvořit i tri- či tetranukleotidy. SSR přispívají rovněž ke struktuře DNA, organizaci chromatinu, regulaci transkripce, translace či genové exprese (Chistiakov a kol., 2006).

K detekci mikrosatelitních sekvencí se využívá PCR. Pomocí dvou primerů, které nasedají na úseky hraničící s mikrosatelity, se definuje mikrosatelitní lokus. Tyto ohraničující sekvence bývají konzervativní pouze v rámci druhu. Z tohoto důvodu je nutné navrhovat pro každý druh novou sadu primerů. Výsledkem amplifikace je vznik různě dlouhých amplikonů, které se následně separují pomocí gelové elektroforézy (Šmarda a kol., 2005).

Tato metoda se nejčastěji používá k odlišení blízce příbuzných jedinců či k detekci vztahů mezi nimi zejména v populační genetice (Šmarda a kol., 2005)

#### **2.3.3.5 ISSR – PCR**

ISSR, neboli Inter Simple Sequence Repeats je technika založená na principu PCR, využívající mikrosatelitů jako primerů (Pradeep Reddy a kol., 2002). Tato metoda byla vyvinuta v 90. letech 20. století. Principem metody je amplifikace úseků mezi dvěma mikrosatelity (SSR). Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetitivní úseky DNA o velikosti 2-6 bází. ISSRs jsou segmenty nacházející se mezi dvěma mikrosatelity o velikosti 16-25 bp (Ng, 2015). Vzhledem k absenci SSRs fragmentů u prokaryot, lze tuto metodu využívat pouze u eukaryotních organismů (Pradeep Reddy a kol., 2002).

Ve srovnání se standardní PCR se v ISSR-PCR používá pouze jeden primer, který komplementárně nasedá na mikrosatelit a následně amplifikuje úsek mezi dvěma mikrosatelity. K vizualizaci se využívá interkalačních činidel a následné elektroforézy (Ng, 2015).

Technika kombinuje výhody AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Narozdíl od RAPD jsou primery v ISSR delší, proto metoda vykazuje i větší přesnost. Mezi další výhody patří jednoduchost, finanční nenáročnost, nenáročnost na kvalitu použité DNA, vysoká reprodukovatelnost a rovněž hypervariabilita markeru. Nevýhody spočívají v nutnosti optimalizace pro daný organismus (zejména primerů a teploty anaelingu) a určitým znevýhodněním je i dominantnost markeru (Ng, 2015; Pradeep Reddy a kol., 2002)

Metoda nachází uplatnění např. v DNA fingerprintingu, genetickém mapování, genetické diverzitě, fylogenetické analýze ad. (Pradeep Reddy a kol., 2002).

#### **2.3.3.6 Sekvenování DNA**

Sekvenování je proces, během kterého je stanovena primární struktura neboli pořadí nukleotidů v molekulách DNA. K sekvenování DNA bylo vyvinuto velké množství metod. Mezi základní metody se řadí chemické sekvenování dle Maxam-Gilberta a enzymové sekvenování dle Sangera. Z těchto dvou metod je v současnosti nejvíce využívané Sangerovo sekvenování (Šmarda a kol., 2005).

Templátovou DNA pro Sangerovo sekvenování je jednovláknová DNA (Adams, 2008). K získání jednovláknové DNA se využívá asymetrická PCR, kdy se využívá pouze jednoho specifického primeru o délce asi 18 bází (Šmarda a kol., 2005). K navázanému primeru se následně pomocí DNA-polymerázy připojují volné deoxyribonukleotidy (dNTPs) a jeden z dideoxynukleotidů (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), které jsou oproti dNTPs zastoupeny v nízké koncentraci. Reakce probíhá ve čtyřech oddělených zkumavkách. Vzhledem k chybějící 3'-OH skupině u dideoxynukleotidů se po jejich navázání syntéza řetězce ukončí, slouží tedy jako terminátor syntézy DNA. Vizualizace různě dlouhých takto vzniklých fragmentů probíhá pomocí elektroforézy, kdy se na polyakrylamidový gel nanesou vedle sebe obsahy všech čtyřech zkumavek. Vizualizované profily se postupně odečítají směrem vzhůru (Adams, 2008; Šmarda a kol., 2005).

Jednodušší a rychlejší variantou Sangerova sekvenování je využití kapilární elektroforézy, při které se využívá dideoxynukleotidů, které jsou fluorescenčně značeny. V této metodě lze použít jen jednu zkumavku zahrnující všechny dideoxyribonukleotidy, volné deoxyribonukleotidy, primer, DNA-polymerázu a templátovou DNA. Elektroforéza probíhá v jedné skleněné kapiláře. V současné době se Sangerova metoda prakticky využívá již jen společně s kapilární elektroforézou, kterou lze dále využít i pro fragmentační analýzu (Šmarda a kol., 2005).

#### **2.3.3.7 Elektroforéza**

Elektroforéza je v molekulární biologii jedna z nejvíce používaných separačních technik. Využívá se k analýze nukleových kyselin a bílkovin. Jejím

principem je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Nukleové kyseliny mají negativně nabitě fosfátové skupiny, proto se v elektrickém poli pohybují směrem ke kladně nabitě elektrodě, neboli anodě (Šmarda a kol., 2005).

Elektroforéza se provádí v nosiči, kterým může být v případě separace nukleových kyselin agarózový nebo polyakrylamidový gel. Polyakrylamid nebo agaróza tvoří síťovou strukturu polymerních molekul s póry. Jejich velikost lze ovlivnit koncentrací polymeru v roztoku a jeho složením. Nejčastěji se využívá agarózových gelů, které jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti 100 bp až 50 kb (Šmarda a kol., 2005). Výhody agarózových gelů spočívají v netoxičnosti a snadné přípravě. Polyakrylamidový gel se používá pro separaci menších molekul DNA. Nevýhodou je jeho toxicita (Tietz a kol., 1998).

Zařízení, ve kterém gelová elektroforéza probíhá, se nazývá elektroforetická vana. Ta je připojena ke dvěma elektrodám. Rychlost migrace DNA v agarózovém gelu ovlivňuje elektrické napětí. Obvykle se uplatňuje napětí 4 – 10 V na centimetr délky vany (dle pufru). Nezbytnou součástí pro správný průběh elektroforézy je pufr (nejčastěji TBE pufr). K vizualizaci fragmentů nukleových kyselin se používá interkalační činidlo, např. ethidium bromid nebo SYBR Green. Detekování fragmentů probíhá pod UV zářením v přístroji zvaném transiluminátor (Brown, 1998).

K analýze genetické stability *S. cerevisiae* v této práci byla použita metoda ISSR – PCR a sekvenování ITS regionu.

### **3. CÍLE PRÁCE**

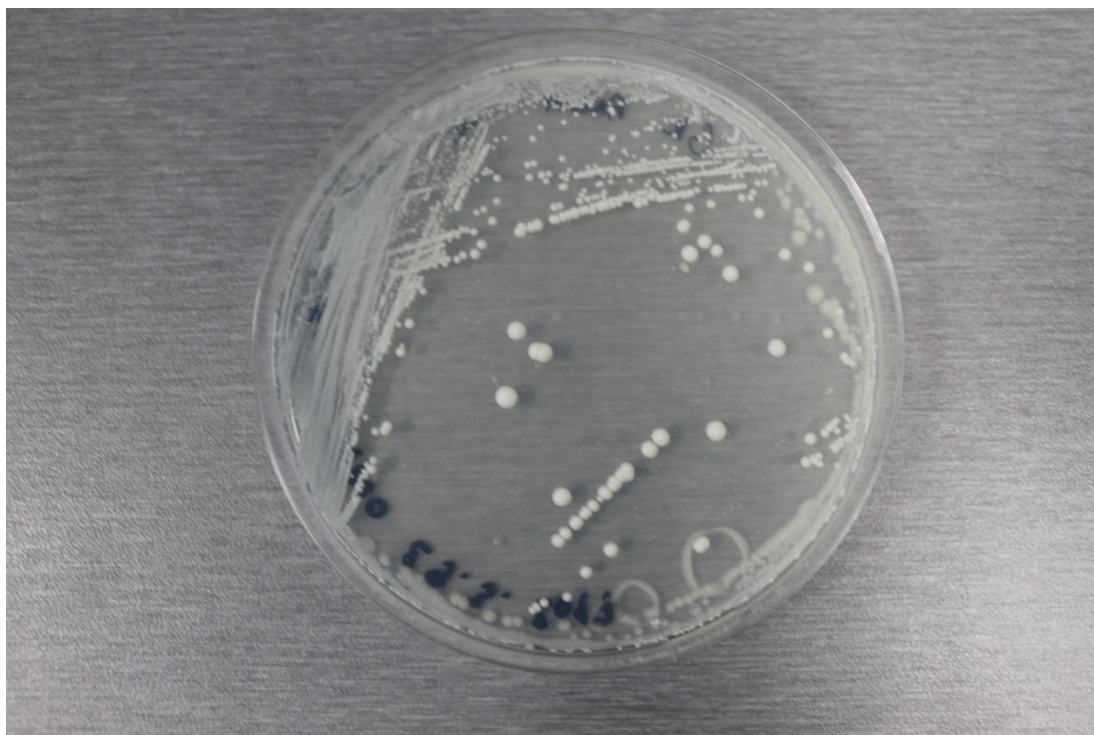
1. Zjištění genetické stability *Saccharomyces cerevisiae* pomocí analýzy ISSR sekvencí a sekvenováním ITS regionu během pasážování a uchovávání této kvasinky v -26°C a -80°C.
2. Testování vhodných ISSR primerů pro *S. cerevisiae*.
3. Získání čisté kultury *S. cerevisiae* z droždí.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 *Saccharomyces cerevisiae* a kultivační podmínky

K pokusu byla použita *Saccharomyces cerevisiae* získaná z droždí značky Linco (země výroby Německo). Malá část droždí byla nanášena na GK agar (1 g kvasničného extraktu, 20 g glukózy, 20 g agaru, doplněno destilovanou vodou na celkový objem 1 l, pH upraveno na 6,8) a inokulační kličkou byl proveden křížový roztěr. Následně proběhla kultivace při 37°C po dobu 3 dnů. Narostlá kolonie byla z jedné kolonie ještě 2x pasážována. Tímto způsobem byla získána čistá kultura (Obr. 8).

Obr. 8 - Čistá kultura *S. cerevisiae*



Zdroj: Vlastní foto

Následně byly vytvořeny 3 pokusné vzorky:

1. *S. cerevisiae* byla kultivována na GK agaru (1 g kvasničného extraktu, 20 g glukózy, 20 g agaru, doplněno destilovanou vodou na celkový objem 1 l, pH upraveno na 6,8) při 37°C a každých 7 dní po dobu 4 měsíců pasážována.

2. *S. cerevisiae* byla kultivována v GK tekutém médiu (1 g kvasničného extraktu a 20 g glukózy doplněno destilovanou vodou na celkový objem 1 l, pH 6,8) při teplotě 37°C po dobu 24 hodin. Následně byla uložena do mrazícího zařízení a uchovávána při teplotě -26°C po dobu 4 měsíců.

3. *S. cerevisiae* byla kultivována v GK tekutém médiu při teplotě 37°C po dobu 24 hodin. Následně byla uložena do mrazícího zařízení a uchovávána při teplotě -80°C po dobu 4 měsíců.

### 4.3 Izolace DNA z kvasinek

DNA byla izolována z narostlé kvasinkové kultury dle protokolu (Harju a kol., 2004), který byl optimalizován. Kolonie *Saccharomyces cerevisiae* byla kultivována v 1,5 ml YPD média (1% kvasničný extrakt, 2% glukóza, 2% pepton) po dobu 20 hodin při teplotě 30°C. Následně byl vzorek centrifugován po dobu 5 minut, 20 000 x g, při teplotě 21°C. Ke vzorku bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA). Mikrocentrifugační zkumavka se vzorkem byla ponořena na 2 minuty do tekutého dusíku. Následně byla přenesena do vodní lázně o teplotě 95°C po dobu 1 minuty. Ponoření do tekutého dusíku a následné vodní lázně bylo ještě jednou opakováno. Vzorek byl vortexován po dobu 30 sekund. Bylo přidáno 200 µl chloroformu, následně byl vzorek vortexován po dobu 2 minut. Vzorek byl centrifugován po dobu 3 minut, 20 000 x g, teplota 21°C. Vodná fáze byla přenesena do nové mikrocentrifugační zkumavky se 400 µl ledového 96% ethanolu. Vzorek byl promíchán a při pokojové teplotě inkubován po dobu 5 minut. Vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut, 20 000 x g, teplota 21°C. Supernatant byl odsán a peleta byla promyta 500 µl 70% ethanolu. Vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut, 20 000 x g, teplota 21°C. Supernatant byl odsán a peleta při pokojové teplotě sušena po dobu 5 minut. Peleta byla rozpuštěna ve 25 µl destilované H<sub>2</sub>O.

Koncentrace a čistota DNA byla ověřena na přístroji BioSpec-nano (Shimadzu, USA).

### 4.4 ISSR – PCR

Reakční směs PCR byla připravena v celkovém objemu 20 µl pro každý z primerů (Tab.1) v tomto složení:



- 10 µl Combi PPP Master Mix (Top Bio, ČR)
- 1 µl BSA
- 1 µl templátové DNA
- 1 µl primeru
- 7 µl sterilní destilované H<sub>2</sub>O

PCR program byl zahájen počáteční denaturací při 95°C po dobu 2 minut. Následovala denaturace při 93°C po dobu 20 sekund. Annealing probíhal při teplotě optimální pro použitý primer (Tab. 1) po dobu 1 minuty. Elongace probíhala při teplotě 72°C po dobu 20 sekund. Denaturace, annealing a elongace se opakovaly ve 40 cyklech. Program byl zakončen závěrečnou elongací při teplotě 72°C po dobu 6 minut. Následovalo zchlazení vzorků na 4°C a při této teplotě byly udržovány.

Tab. 1 – ISSR primery použité na PCR a jejich sekvence

Primer	Sekvence	T <sub>m</sub>
UBC 807	5' – AGA GAG AGA GAG AGA GT – 3'	54°C
UBC 812	5' – GAG AGA GAG AGA GAG AA – 3'	54°C
UBC 823	5' – TCT CTC TCT CTC TCT CC – 3'	54°C
UBC 825	5' – ACA CAC ACA CAC ACA CT – 3'	54°C
UBC 826	5' – ACA CAC ACA CAC ACA CC – 3'	54°C
UBC 827	5' – ACA CAC ACA CAC ACA CG – 3'	54°C
UBC 834	5' – AGA GAG AGA GAG AGA GYT – 3'	49,2°C
UBC 836	5' – AGA GAG AGA GAG AGA GYA – 3'	54°C
UBC 840	5' – GAG AGA GAG AGA GAG AYT – 3'	54°C
UBC 841	5' – GAG AGA GAG AGA GAG AYC – 3'	48,5°C
UBC 845	5' – CTC TCT CTC TCT CTC TRG – 3'	54°C
UBC 880	5' – GGA GAG GAG AGG AGA – 3'	54°C

#### 4.5 Elektroforéza

Po PCR byly vzorky nanášeny na 2% agarózový gel s 1 × TBE (Sigma-Aldrich, USA) a interkalačním činidlem Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA). Vlastní elektroforéza probíhala po dobu 120 minut při 5 V/cm. Agarózový gel byl vizualizován pomocí UV prosvěcovací lampy a dokumentačního zařízení InGenius3 (Syngene, UK).

#### 4.6. Sekvenování regionu ITS

Reakční směs PCR byla vytvořena v celkovém objemu 25  $\mu$ l v tomto složení:

- 12,5  $\mu$ l Combi PPP Master Mix (Top Bio, ČR)
- 11  $\mu$ l sterilní destilované H<sub>2</sub>O
- 0,5  $\mu$ l primeru ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)
- 0,5  $\mu$ l primeru ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)
- 1  $\mu$ l templátové DNA

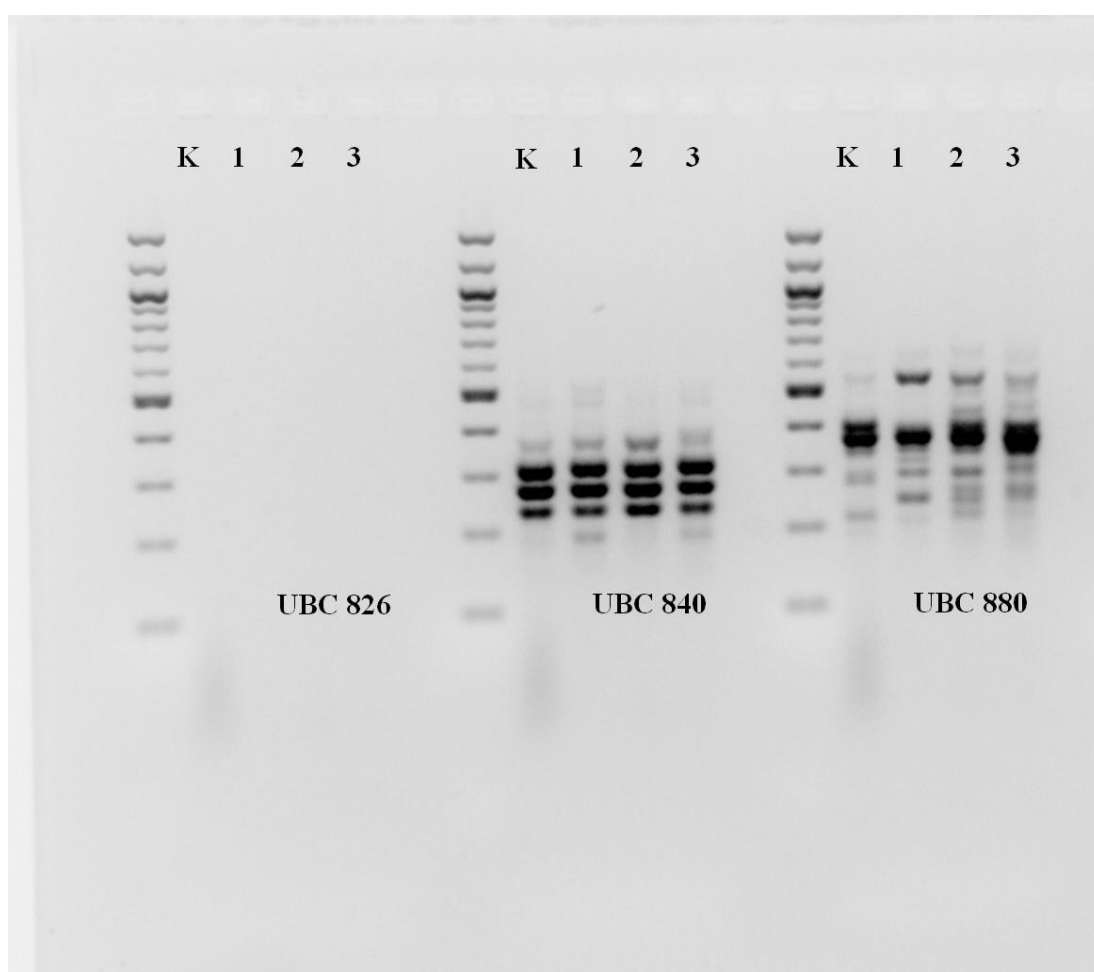
PCR program byl zahájen počáteční denaturací při 95°C po dobu 5 minut. Následovala denaturace, 95°C po dobu 40 sekund. Annealing probíhal při 57°C po dobu 30 sekund. Následná elongace probíhala při 72°C po dobu 40 sekund. Závěrečná elongace probíhala při 72°C po dobu 1 minut. Program byl zakončen zchlazením vzorku na 4°C a při této teplotě byl udržován.

Úspěšnost amplifikace byla ověřena elektroforeticky z 5  $\mu$ l reakční směsi odebrané po PCR. Další 5  $\mu$ l reakční směsi bylo enzymaticky přečištěno pomocí 1  $\mu$ l ExoSAP-IT<sup>TM</sup> PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Tato směs byla inkubována při 37°C po dobu 15 minut a následně při 80°C po dobu 15 minut. Po zchlazení bylo přidáno 5  $\mu$ l primeru ITS 1. Takto připravený vzorek byl odeslán společnosti MacroGen (NL) k sekvenační analýze.

## 5. VÝSLEDKY

Z vytvořené čisté kultury *S. cerevisiae* byla úspěšně izolována DNA, která následně sloužila jako templátové vlákno DNA pro reakci ISSR-PCR. Při této reakci byly vyzkoušeny primery uvedené v Tab. 1. Intermikrosatelitní lokus byl naamplifikován primery UBC 840 a UBC 880 (Obr. 9), ostatní primery pravděpodobně nejsou s mikrosatelity *S. cerevisiae* komplementární a tudíž úseky mezi nimi neamplifikují, případně nebyly výsledky reprodukovatelné.

Obr. 9 – ISSR analýza pomocí primerů UBC 826, UBC 840 a UBC 880



Zdroj: Vlastní foto

Do prvního slotu primeru UBC 840 byl nanesen výchozí (kontrolní) vzorek DNA *S. cerevisiae* získaný z původní kultury (K). Druhý slot obsahuje vzorek DNA kultury, která byla pasážována (1). Třetí slot obsahuje vzorek DNA, která byla uchovávána v -26°C (2) a ve čtvrtém slotu je umístěn vzorek DNA, která byla

uchovávána v  $-80^{\circ}\text{C}$  (3). Vizualizované fragmenty měly velikost od 200 do 380 bp. U primeru UBC 840 jsou profily všech vzorků totožné, z čehož je možno usoudit, že během uchovávání nedošlo ke změně na tomto intermikrosatelitním lokusu. U primeru UBC 880 je pořadí vzorků totožné s primerem UBC 840. Vizualizované fragmenty měly velikost od 225 do 550 bp. Dle jejich profilů lze soudit, že došlo ke změnám v úsecích amplifikovaných tímto primerem. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno ke skórování, kdy byla vytvořena binární matice (Tab. 2). Tato matice byla vytvořena z fragmentů, které byly vizualizovány na agarózovém gelu.

Tab. 2 – Binární matice vytvořená dle vizualizace primeru UBC 880 na agarózovém gelu

	<b>Kontrola</b>	<b>Pasážování</b>	<b>-26°C</b>	<b>-80°C</b>
<b>550 bp</b>	1	1	1	1
<b>400 bp</b>	1	0	1	1
<b>370 bp</b>	1	1	1	1
<b>300 bp</b>	1	1	1	1
<b>250 bp</b>	0	1	1	1
<b>225 bp</b>	1	1	1	0

Z této matice byla pomocí vytvořených kontingenčních tabulek a koeficientu Nei-Li (Nei a Li, 1979), který se používá pro dominantní markery, zkonstruována podobnostní matice (Tab. 3).

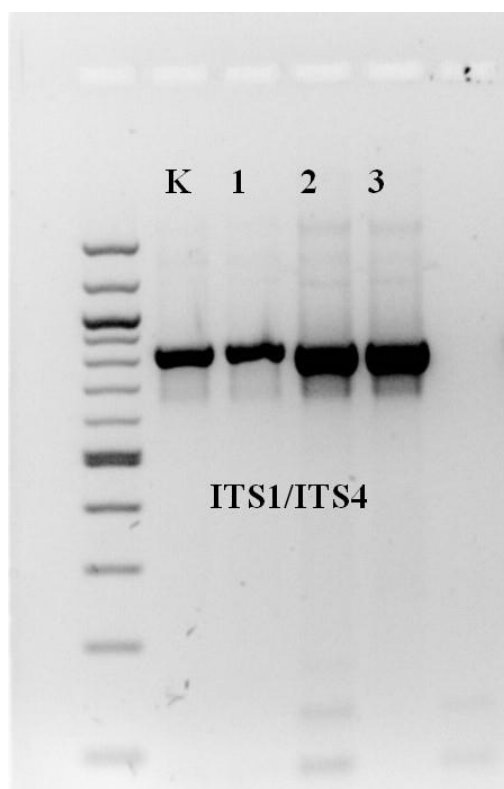
Tab.3 – Podobnostní matice koeficientu Nei-Li

	<b>Kontrola</b>	<b>Pasážování</b>	<b>-26°C</b>	<b>-80°C</b>
<b>Kontrola</b>	1			
<b>Pasážování</b>	0,8	1		
<b>-26°C</b>	0,9	0,9	1	
<b>-80°C</b>	0,8	0,8	0,9	1

Mezi DNA kolonie izolované z původní čisté kultury (K) a DNA kolonie z kultury, které byla pasážována (1) je podobnost 0,8. Tuto podobnost lze hodnotit jako nižší. Nižší podobnost také vyskytují vzorky K a 3 nebo 1 a 3. Mezi DNA kvasinky uchovávané v -26°C (2) a kvasinky uchovávané v -80°C (3) je podobnost 0,9. Tuto podobnost lze hodnotit jako vyšší. Vyšší podobnost DNA rovněž vykazuje porovnání vzorků 1 a 2 nebo 2 a 3. Z toho lze usuzovat, že u vzorku 1 se v průběhu pasážování intermikrosatelitní lokus ve srovnání s vzorky uchovávanými v mrazu změnil. Vzorky uchovávané v mrazáku vykazují mezi sebou vysokou podobnost, ale ve srovnání s původní kulturou již podobnost nižší. Z tohoto faktu je možno vyvodit, že intermikrosatelitní lokusy amplifikované primerem UBC 880 se v průběhu času při různých uchováváních mění.

Při vizualizaci ITS regionů agarózovou elektroforézou bylo zjištěno, že tyto lokusy jsou u *S. cerevisiae* velké 800 bp (Obr. 10).

Obr. 10 – ITS regiony u *S. cerevisiae*



Zdroj: Vlastní foto

Po sekvenování ITS regionu bylo po zarovnání (alignmentu) získaných sekvencí vyvozeno, že v regionu ITS během uchovávání v různých podmínkách

nedošlo k žádné změně – 100% shoda nukleotidových sekvencí všech vzorků. Z toho lze usoudit, že různé způsoby uchovávání pravděpodobně na tento lokus vliv nemají.

## 6. DISKUZE

Kvasinky mají díky svému rychlému reprodukčnímu cyklu schopnost měnit svoji genetickou informaci v poměrně krátkém čase. V praktickém využití kvasinek (např. pivovarství apod.) je důležité, aby používaný kmen kvasinky byl stabilní a nedocházelo ke změnám. Případné změny v genetické informaci by mohly mít vliv na následující výrobní proces. K tomuto účelu se využívá determinace kvasinek. Běžné metody detekce kvasinek jsou časově náročné, pracné a často nejsou schopny rozlišit kvasinky na úrovni druhu, což by mohlo mít za následek chybnou identifikaci. V tomto směru se začaly hojně využívat metody DNA fingerprintingu, které poskytují přesnější a rychlejší výsledky.

Pro správnou identifikaci je zásadní čistota kultury. Čistá kultura představuje pomnožení jedné buňky kultivované *in vitro*. Aby byla získaná kultura *S. cerevisiae* opravdu čistá, bylo zapotřebí ji několikrát pasážovat. Izolace genomové DNA kvasinky byla provedena způsobem, který uvádí Harju a kol. (2004). Pro izolaci byla použita 1 KTJ *S. cerevisiae* kultivované v 37°C po dobu 5 dnů. Po této době byla kultura dostatečně narostlá. Tento způsob izolace ve srovnání s izolací DNA komerčně dostupným kitem zajistil vysokou výtěžnost a dostačující čistotu získané DNA.

ISSR je dominantní molekulární marker, který lze použít k detekci a typizování druhu u eukaryotních organismů, nejčastěji rostlin. Tento marker využili k úspěšné detekci kvasinek Pathania a Kanwar (2010), kterým se pomocí ISSR primeru podařilo detekovat *S. cerevisiae* ve fermentovaných potravinách. Rovněž El-Assal a kol. (2011) touto metodou úspěšně detekovali *S. cerevisiae*. Dansakul (2009) pomocí vybraných ISSR primerů úspěšně detekoval kvasinku *Saccharomyces fibulingeri* v rýžovém vínu. Gallardo a kol. (2014) však zmiňuje, že tato metoda nemusí být vždy u mikroorganismů lehce použitelná a úspěšná.

K určení genetické stability *S. cerevisiae* bylo testováno 12 ISSR primerů. Spolehlivost při amplifikaci vykazovaly pouze primery UBC 840 a UBC 880, který generoval 5 polymorfních fragmentů o velikostech od 225 do 550 bp. Ostatní primery neamplifikovaly žádný produkt, případně výsledky nebyly reprodukovatelné. Dansakul (2009) pomocí primeru UBC 880 rovněž úspěšně

amplifikoval, ale primer UBC 840 na *Saccharomycopis fibulingeri* amplifikovatelný nebyl. Tento jev poukazuje na to, že i mezi poměrně příbuznými druhy mohou být rozdíly, a je proto nutné testovat specifické ISSR pro každý organismus.

Při určování genetické stability byly porovnávány profily kultury původní, pasážované, uchovávané v -26°C a v -80°C. Polymorfni fragmenty generované primerem UBC 840 nevykazují při vizualizaci na agarózovém gelu žádnou změnu. Z toho lze usoudit, že intermikrosatelitní lokus amplifikovaný tímto primerem zůstal v průběhu času nezměněný. Primer UBC 880 vykazuje při vizualizaci na první pohled viditelné změny mezi profily jednotlivých vzorků, proto lze dedukovat, že intermikrosatelitní lokus amplifikovaný tímto primerem se v průběhu času mění. Následné skórování a vytvoření podobnostní matice koeficientu Nei-Li u tohoto primeru ukázalo rozdíly mezi jednotlivými vzorky.

Před sekvenováním ITS regionu byl PCR produkt ověřen na agarové elektroforéze. Vizualizovaný fragment byl veliký 800 bp. Tuto velikost ITS regionu získaného pomocí primerů ITS1/ITS4 u *S. cerevisiae* uvádí i Arlorio a kol. (1999). Po sekvenování tohoto lokusu bylo zjištěno, že ITS region u všech sledovaných vzorků během uchovávání nepodléhal změnám.

Pro přesnější analýzu změn během uchovávání a charakterizaci kvasinky by bylo vhodné provést ještě další analýzy molekulárních markerů, např. RAPD, AFLP nebo SSR.



## 7. ZÁVĚR

Kvasinky jsou v potravinářské výrobě naprosto nepostradatelné. V literárním přehledu byly shrnuty nejčastěji využívané kvasinky v potravinářském průmyslu. Mezi nejvyužívanější kvasinku patří *Saccharomyces cerevisiae*. Tento mikroorganismus se využívá v pivovarství, vinařství, pekárenství, lihovarství, ale rovněž slouží jako modelový organismus pro eukaryotní organismy, čehož se využívá zejména v genovém inženýrství.

Hlavním cílem práce bylo zjistit genetickou stabilitu *S. cerevisiae* pomocí analýzy ISSR lokusů a sekvenováním ITS regionů. DNA z vybrané kvasinky byla izolována z vytvořené čisté kultury. Bylo testováno 12 ISSR primerů, z nichž se pomocí dvou podařilo úspěšně a opakovatelně amplifikovat specifické spektrum fragmentů. Pomocí těchto dvou primerů byly porovnány intermikrosatelitní profily jednotlivých vzorků. Bylo zjištěno, že zatímco lokus amplifikovaný primerem UBC 840 se nemění, u úseku amplifikovaného primerem UBC 880 ke změně dochází. Různé druhy uchovávání kvasinky *S. cerevisiae* mají pravděpodobně vliv na podobu tohoto intermikrosatelitního lokusu. Jako další molekulární marker byl sekvenován ITS region. Během uchovávání této kvasinky ke změně v ITS regionu nedošlo a testované způsoby uchovávání na něj nemají vliv. Závěrem lze tedy říci, že správné uchovávání této průmyslově významné kvasinky je pravděpodobně důležité pro její genetickou stabilitu a bylo by vhodné doplnit studii o analýzy dalších molekulárních markerů.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADAMS J. (2008). DNA sequencing technologies. *Nature Education*. 1(1), 193
- AKSU Z. a EREN A. T. (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*. **35**(2), 107-113.
- ARLORIO M., COÏSON J. D. a MARTELLI A. (1999). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA. *European Food Research and Technoogy*. **209**, 185-191.
- AUGUSTOVÁ K. (2010). Taxonomické zařazení kvasinek rodu *Saccharomyces*. [Diplomová práce]. Brno. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
- BASAŘOVÁ G., ŠAVEL J., BASAŘ P. a LEJSEK T. (2010). Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Praha: Vydavatelství VŠCHT. 904 s. ISBN 9788070807347.
- BOTSTEIN D., WHITE R. L., SKOLNICK M. a DAVIS M. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. **32**(3), 314-331.
- BOULTON Ch. a QUAIN D. (2001). *Brewing Yeast and Fermentation*. Bodmin: Blackwell Science. 660 s. ISBN 978-1-4051-5268-6.
- BREUER U. a HARMS H. (2006). *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*. **23**(6), 415-437.
- BROWN T. A. (1998). *Molecular Biology Labfax II: Gene Analysis*. 2nd ed. San Diego: Academic Press. 255 s. ISBN 0121361101.
- BROWN T. A. (2001). Southern Blotting and Related DNA Detection Techniques. *Encyclopedia of Life Sciences*. **20**, 1-6.
- BUBNOVÁ M., ZEMANČÍKOVÁ J. a SYCHROVÁ H. (2014). Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses. *Yeast*. **31**(8), 309-321.
- CAETANO-ANOLLES G. a GRESSHOFF P. M. (1997). *DNA markers: protocols, applications, and overviews*. New York: Wiley-VCH. 364 s. ISBN 0471160679.
- CANO-GARCÍA L., FLORES M. a BELOCH C. (2013). Molecular characterization and aromatic potential of *Debaryomyces hansenii* strains isolated from naturally fermented sausages. *Food Research International*. **52**(1), 42-49.

DANSAKUL S., LEELAWATCHERAMAS V., CHAROENCHAI CH., URAIRONG H. (2009) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) marker for typing of *Saccharomycopsis fibuligera* isolated from Loog-pang, Kao-mag and Satho. *Natural Science*. **43**, 339-347.

DE VUYST L., HARTH H., VAN KERREBROECK S. a LEROY F. (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology*. **239**, 26-34.

EL-ASSAL S. E., ABD-ALLA S. M., ABOU SEADA M. N. (2011). Molecular and biochemical studies of some yeast strains. *African Journal of Biotechnology*. **10**(8), 1309-1319.

FELDMANN H. (2011). Yeast: Molecular and Cell Biology. Ed. 1st. Hoboken: John Wiley & Sons. 464 s. ISBN 3527644865.

GALLARDO G., RUIZ-MOYANO S., HERNÁNDEZ A., BENITO M. J., CÓRDOLA M. G., PÉREZ-NEVADO F. (2014). Application of ISSR-PCR for rapid strain typing of *Debaryomyces hansenii* isolated from dry-cured Iberian ham. *Food Microbiology*. **42**, 205-211.

GIBSON B. a LITI G. (2015). *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast*. **32**(1), 17-27.

HAMES B. D. a HOOPER N. M. (2005). Biochemistry. 3rd ed. New York, N.Y.: Taylor & Francis. 438 s. ISBN 0415367786.

HARJU S., FEDOSYUK H. a PETERSON K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology* **4**(1), 4-8.

HARVEY R. A. a FERRIER D. R. (2011). Biochemistry: Lippincott's Illustrated Reviews. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health. 552 s. ISBN 160831412X.

HERNÁNDEZ-ALMANZA A., MONTANEZ D. R., AGUILAR-GONZÁLEZ M. A., MARTÍNEZ-ÁVILA C., RODRÍGUEZ-HERRERA R. a AGUILAR C. N. (2013). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*. **5**, 64-72.

CHISTIYAKOV D. A., HELLEMANS B. a VOLCKAERT F. A. M. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. **255**(1-4), 1-29.

IVANOVA V., BASAŘOVÁ G. a RYCHTERA M. (1989). Využití imobilizovaných buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ke kontinuální výrobě ethanolu: I. Perspektivy využití. *Kvasný průmysl*. **35**(2), 41-44.

JANDEROVÁ B. a BENDO VÁ O. (1999). Úvod do biologie kvasinek. Praha: Karolinum. 108 s. ISBN 8071849901.

KIRBY L. T. (1990). DNA fingerprinting: an introduction. New York: Stockton Press. 365 s. ISBN 09-358-5994-2.

KING A. a DICKINSON J. R. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. **16**(6), 499-506.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A. (1982). Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Bratislava: Alfa. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa). 483 s. ISBN 6315482.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A. (1990). Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa. Edícia potravinárskej literatúry. 699 s. ISBN 8005006446.

KOCHLÁŇOVÁ T., KIJ D., KOPECKÁ J., KUBIZNIAKOVÁ P. a MATOULKOVÁ D. (2016). Kvasinky non-*Saccharomyces* a jejich význam v pivovarském průmyslu. II. část. *Kvasný průmysl*. **62**(7-8), 206-214.

KOPECKÁ J., MATOULKOVÁ D. a NĚMEC M. (2012). Kvasinky a jejich využití. *Kvasný průmysl*. **58**(11-12), 326-335.

KRESCANKOVÁ K., KOPECKÁ J., NĚMEC M. a MATOULKOVÁ D. (2015). Charakterizace technologicky využívaných kvasinek rodu *Saccharomyces*. *Kvasný průmysl*. **61**(6), 174-185.

KURTZMAN C. P. a kol. (2011). The yeasts: a taxonomic study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 2354 s. ISBN 9780123848680.

LIU H. H., JI X. a HUANG H. (2015). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology Advances*. **33**(8), 1522-1546.

LODOLO E. J., KOCK J. L. F., AXCELL B. C. a BROOKS M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*. **8**(7), 1018-1036.

NEI M., LI W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **76**(10), 5269-5273.

NG W. L. a TAN S. G. (2015). Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? *ASM Science Journal*. **9**(1), 30-39.

- NICAUD J. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. **29**(10), 409-418.
- PANESAR P. S., PANESAR R., SINGH R. S., KENNEDY J. F. a KUMAR H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **81**(4), 530-543.
- PATHANIA N., KANWAR S. S., JHANG T., KOUNDAL K. R. a SHARMA T. R. (2010). Application of different molecular techniques for deciphering genetic diversity among yeast isolates of traditional fermented food products of Western Himalayas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **26**, 1539-1547.
- PAUN O. a SCHÖNSWETTER P. (2012). Amplified Fragment Length Polymorphism: An Invaluable Fingerprinting Technique for Genomic, Transcriptomic, and Epigenetic Studies. *Methods in Molecular. Biology*. **862**, 75-87.
- PELT-VERKUIL E. VAN, BELKUM A. VAN a HAYS J. P. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. Dordrecht: Springer. 330 s. ISBN 9781402062414.
- PERPETUINI G., DI GIANVITO P., ARFELLI G., SCHIRONE M., CORSETTI A., TOFALO R. a SUZZI G. (2016). Biodiversity of autolytic ability in flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains suitable for traditional sparkling wine fermentation. *Yeast*. **33**(7), 303-312.
- PRADEEP REDDY M., SARLA N. a SIDDIQ E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. **128**(1), 9-17.
- PRETORIUS I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. **16**(8), 675-729.
- PRISTA C., MICHÁN C., MIRANDA I. M. a RAMOS J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*. **33**(10), 523-533.
- RAO J. R., FLEMING C. C. a MOORE J. E. (2006). Molecular Diagnostics: Current Technology and Applications. Wymondham: Horizon Bioscience. 379 s. ISBN 190493319X.
- RODICIO, R. a HEINISCH J. J. (2013). Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. **30**(5), 165-177.
- RUBIO-TEXEIRA M. (2005). Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnology Advances*. **24**(2), 212-225.

SABIROVA J. S., HADDOUCHE R., VAN BOGAERT I. N., MULAA F., VERSTAETE W., TIMMIS K., SCHMIDT-DANNERT C., NICAUD J., SOETAERT W. (2011). The 'LipoYeasts' project: using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* in combination with specific bacterial genes for the bioconversion of lipids, fats and oils into high-value products. *Microbial biotechnology*. **4**(1), 47-54.

SAMPAIO F. C., CHAVES-ALVES V. M., CONVERTI A., LOPES PASSOS F. M. a CAVALCANTE COELHO J. L. (2007). Influence of cultivation conditions on xylose-to-xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*. **99**(3), 502-508.

SHAFIQUE S. (2012). Polymerase chain reaction: procedure, principles, real time PCR, optimization, applications, PCR arrays, array system performance, protocol, variations. Neue Ausg. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Pub. 96 s. ISBN 3659134791.

SHARMA R. R., SINGH D. a SINGH R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*. **50**(3), 205-221.

SNUSTAD D. P. a SIMMONS M. J. (2009). Genetika. Brno: Masarykova univerzita. 871 s. ISBN 9788021048522.

SPOHNER S. C., SCHAUM V., QUITMANN H. a CZERMAK P. (2016). *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. **222**, 104-116.

SRIVASTAVA P. S., NARULA A. a SRIVASTAVA S. (2004). Plant biotechnology and molecular markers. New Delhi: Anamaya Publishers. 400 s. ISBN 14-020-1911-4.

ŠILHÁNKOVÁ L. (2002). Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., Praha: Academia. 363 s. ISBN 8020010246.

ŠANDULA J., MASNER L. a VOJTKOVÁ A. (1984). Výroba mikróbných bielkovín zo srvátky. *Kvasný průmysl*. **30**(2), 31-34.

ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V. a KOPTÍKOVÁ J.. (2005). Metody molekulární biologie. Brno: Masarykova univerzita. 192 s. ISBN 8021038411.

TIETZ D. a kol. (1998). Nucleic Acid Electrophoresis. Berlin: Springer. Springer lab manual. 328 s. ISBN 3540639594.

TROPP B. E. (2012). *Molecular biology: genes to proteins*. 4th ed. Sudbury, Mass: Jones & Bartlett Learning. 1000 s. ISBN 0763786632.

VARELA C., a BORNEMAN A. R. (2016). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*. **34**(3), 111-128

VILLALBA M. L., SÁEZ J. S., DEL MONACO S., LOPES Ch. A. a SANGORRÍN M. P. (2016). TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspota delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. **217**, 94-100.

VOPÁLENSKÁ I., HŮLKOVÁ M., JANDEROVÁ B. a PALKOVÁ Z. (2005). The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. *Research in Microbiology*. **156**(9), 921-931.

VOS P. a kol. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. **23**(21), 4407-4414.

WEAVER R. F. (2005). *Molecular biology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill. 914 s. ISBN 0072846119.

WEISING K., NYBOM H., WOLFF K. a MEYER W. (1995). *DNA fingerprinting in plants and fungi*. Boca Raton: CRC Press. 322 s. ISBN 0849389208.

YEN H., LIU Y. X. a CHANG J. (2014). The effects of feeding criteria on the growth of oleaginous yeast—*Rhodotorula glutinis* in a pilot-scale airlift bioreactor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. **49**, 67-71.

ZINJARDE S. S. (2013). Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry*. **152**, 1-10.