

Kvasinky a jejich využití

Yeast And Its Uses

JANA KOPECKÁ¹, DAGMAR MATOULKOVÁ², MIROSLAV NĚMEC¹

¹ Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita Brno, Tvrdého 14, 602 00 Brno / *Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Tvrdého 14, 602 00 Brno, Czech Republic*

² Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, Lípová 15, 120 44 Praha 2, Czech Republic*

e-mail: matoulkova@beerresearch.cz

Kopecká, J. – Matoulková, D. – Němec, M.: Kvasinky a jejich využití. Kvasny Prum. 58, 2012, č. 11–12, s. 326–335.

Kvasinky jsou eukaryotní heterotrofní organismy, které patří mezi houby. Od ostatních eukaryot se liší především tvorbou silné a pevné buněčné stěny. Jako zdroj uhlíku a energie slouží kvasinkám hlavně sacharidy, které mohou „zpracovat“ aerobní respirací či kvašením. Využití kvasinek je velmi rozmanité. Nezastupitelný význam mají v potravinářském průmyslu zejména při výrobě pekařského a krmného droždí, piva, vína a lihu. Moderní biotechnologie využívají kvasinky pro produkci nejrůznějších látek (vitamíny, enzymy, antibiotika, aminokyseliny, bílkoviny). Tyto kvasinky mohou být geneticky upravovány tak, aby získaly nové a lepší vlastnosti a syntetizovaly požadované látky. Díky relativně snadnému zacházení (isolace mutantů, přenos genů, kultivace, atd.) a znalosti genomu jsou kvasinky vhodným modelovým organismem pro studium fyziologických a metabolických pochodů i genetiky eukaryot. Mimo to ale některé rody kvasinek patří mezi patogeny, které jsou významné zejména pro jedince s oslabenou imunitou.

Kopecká, J. – Matoulková, D. – Němec, M.: Yeast and its uses. Kvasny Prum. 58, 2012, No. 11–12, p. 326–335.

Yeasts are eukaryotic heterotrophic organisms belonging to fungi. In contrast to other eukaryotes yeasts possess thick and rigid cell wall. As a source of carbon and energy yeast can degrade sugars using two metabolic pathways: aerobic respiration and fermentation. Yeasts are used for various processes. The use of the yeast in food industry as baker's yeast, fodder yeast, for the beer, wine and spirit production is of great importance. Modern biotechnologies use yeast for the production of various substances (vitamins, enzymes, antibiotics, amino acids, proteins). It can be genetically modified to gain new and more convenient properties and to produce desired compounds. Being relatively easy to handle (mutant isolation, gene transfer, cultivation) and of known genome, yeast is a suitable model organism for the study of physiological and metabolic processes and genetics of eukaryotes. However, some of the yeast genera belong to pathogens that are hazardous for immunocompromised people.

Kopecká, J. – Matoulková, D. – Němec, M.: Die Hefe und ihre Anwendung. Kvasny Prum. 58, 2012, Nr. 11–12, S. 326–335.

Die Hefen sind eukaryotische heterotrophe Organismen, die unter die Pilze gehören. Von den anderen Eukaryoten unterscheidet sich die Hefe durch die Bildung einer starken und festen Zellwand. Als Kohlenwasserstoff- und Energiequelle dienen der Hefen vor allem die Sacchariden, die durch die aerobe Respiration oder die Gärung verarbeitet werden können. Die Hefenanwendung ist sehr vielfältig. Die entscheidende Bedeutung wiesen die Hefen in der Lebensmittelindustrie aus, insbesondere bei der Herstellung der Bäcker- und Futterhefe, des Bieres und des Weines. Die moderne Biotechnologie nutzt die Hefe für Produktion von verschiedenen Stoffen (z.B. Vitamine, Enzyme, Antibiotika, Aminosäuren, Proteine) aus. Diese Hefe kann genetisch so behandelt werden, um die neuen und besseren Eigenschaften zur Synthese der gewünschten Stoffe zu erhalten. Dank der relativen einfachen Behandlung (die Mutantenisolation, Genübertragung, Kultivierung u.s.w.) und der Kenntnis des Genoms stellt die Hefe ein geeignetes Modelorganismus zum Studium der physiologischen und metabolischen Vorgänge und der Eukaryotgenetik dar. Einige Hefestämme gehören jedoch unter die Pathogene, die insbesondere für Einzelne mit der geschwächten Immunität bedeutend sind.

Klíčová slova: kvasinky, buňka kvasinek, biotechnologie, *Saccharomyces*, produkční kmen, modelový organismus

Keywords: yeast, yeast cell, biotechnology, *Saccharomyces*, production strain, model organism

■ 1 ÚVOD

Kvasinky jsou jedním z nejvyužívanějších mikroorganismů vůbec. Považujeme je za nejstarší „domestikované“ mikroorganismy. Již ve starém Egyptě a antickém Řecku se vyráběl kynutý chléb a alkoholické nápoje, které byly předchůdci dnešního chleba, piva a vína. Jednotlivé kvasinky poprvé pozoroval Anton van Leeuwenhoek, který je popsal jako „malé kuličky v pivě“. V roce 1857 Louis Pasteur dokázal, že kvašení je „život bez kyslíku“ a že organismy, které kvašení způsobují, nemusí být živé. V dalších letech vydal studii o pivu (*Études sur la bière*, 1876) a vínu (*Études sur la vin*, 1866).

V dnešní době mají kvasinky nezastupitelný význam mezi průmyslovými mikroorganismy, a to především v potravinářském průmyslu pro výrobu kynutého pečiva, alkoholických nápojů, potravinářské a krmné biomasy. Jsou hojně využívány v řadě oblastí vědy, technologie a ve farmaceutickém průmyslu. Významná je jejich produkce biologicky aktivních látek a biodegradční aktivita. Avšak některé druhy kvasinek mohou být považovány za patogenní mikroorganismy.

Díky relativně jednoduché stavbě buňky, znalosti genomu (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), snadné manipulaci a kultivaci patří kvasinky k nejdůležitějším eukaryotickým

■ 1 INTRODUCTION

Yeasts are one of the longest and most intensively used microorganisms ever. They are considered to be the oldest „domesticated“ microorganisms. The raised bread and alcoholic beverages, predecessors of present bread, beer and wine, were produced already in ancient Egypt and ancient Greece. Individual yeast cells were for the first time observed by Anton van Leeuwenhoek, who described them as „small beads in beer“. In 1857 Louis Pasteur proved that fermentation is „a life without oxygen“ and the organisms responsible for the fermentation need not be alive. Later he published a study about beer (*Études sur la bière*, 1876) and wine (*Études sur la vin*, 1866).

At the present time yeast is of extraordinary importance among other industrial microorganisms, particularly in food industry for the production of raised bread, alcoholic beverages and food and fodder biomass. Yeast is widely used in many research areas and technologies and in the pharmaceutical industry. Its ability to produce biologically active substances and biodegradation activity is of great importance. However, some yeasts may be considered as pathogenic.

Owing to relatively simple cell structure, known genome (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), easy handling

modelovým organismům. S rozvojem genového inženýrství vzrostl počet heterologních bílkovin produkovaných kvasinkami.

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní organismy s pevnou buněčnou stěnou. Vyskytují se buď jako elipsoidní jednobuněčné organismy, nebo protáhlé buňky spojené v dlouhá vlákna – pseudomycelia. Český název je odvozen od schopnosti většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy, případně i trisacharidy. Jejich výskyt je díky těmto schopnostem svázán s materiály obsahujícími cukry, zvláště tedy na bobulovém a peckovém ovoci, cukernatých plodinách, ale i v půdě, vodě nebo střevním traktu.

Kvasinky patří do domény Eukarya, říše Fungi – houby, dále však nejsou samostatnou taxonomickou skupinou. Podle způsobu pohlavního rozmnožování se řadí do oddělení *Ascomycota* – vřeckovýtusné houby, *Basidiomycota* – stopkovýtrusné houby. U některých kvasinek není pohlavní rozmnožování známo, ty patří do pomocné skupiny *Deuteromycota* – imperfektní houby, která náleží k oddělení *Ascomycota*. Klasifikace i názvosloví se průběžně mění zejména díky objevování sexuálních stadií, která bývají většinou zafazována mezi *Ascomycota*. Vycházíme-li z hypotézy, že kvasinky vznikly jako redukované formy hub, považují se hyfovité (vláknité) kvasinkovité mikroorganismy za vývojově starší než jednobuněčné formy (Kalina a Váňa, 2005; Kocková-Kratochvílová, 1990).

2 BUŇKA KVASINEK

Buňka kvasinek je eukaryotního typu a je tedy považována za „mnohosložkový“ systém, ve kterém membrány ohraničují reakční prostory, kompartmenty. Velikost buněk je asi 3–15 µm a je dána především rodovou příslušností a způsobem kultivace. Tvar buněk kvasinek do značné míry souvisí se způsobem vegetativního rozmnožování (pučení, příčné dělení), částečně je ovlivněn i vnějšími podmínkami, např. povrchové napětí, složení živného prostředí, oxidačně-redukční potenciál, atd. (Kocková-Kratochvílová, 1957). Zejména je však určen rodovou příslušností. Za základní tvar se považuje rotační elipsoid, se dvěma možnými odchylkami, a to buď na tvary kulaté nebo na podlouhlé až vláknité (Kocková-Kratochvílová, 1957). Kvasinky mohou měnit svůj tvar i během svého vývoje. Buňky rodu *Trigonopsis* mohou mít za určitých kultivačních podmínek i trojúhelníkovitý tvar (Šašek a Becker, 1969). Některé kvasinky vytváří protáhlé buňky, které pučí pouze na pólech a zůstávají spojeny v dlouhá zaškrkovaná vlákna – pseudomycelia. V určitých místech pseudomycelia vznikají svazky blastospor – krátké elipsoidní buňky, např. u rodu *Candida* (Vázquez-Tsuji et al., 2005). U některých rodů (*Candida*, *Rhodotula*) se může vytvářet i tzv. pravé mycelium – vláknito vzniklé příčným dělením protáhlých buněk (Berman, 2006).

Chemické složení buňky kvasinek je závislé na druhu a kmeni, fyziologickém stavu buněk, na kultivačních podmínkách, na živných půdách a na stáří kultury. Voda tvoří hlavní část protoplazmy kvasinek, její obsah je obvykle 65–80 %. Sušina buněk *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje obvykle: dusíkaté látky 45–60 %, cukry 15–37 %, lipidy 2–12 %, minerální látky 6–12 %, dále jsou přítomny růstové látky a některé vitaminy (Bendová a Kahler, 1981).

Kvasinky produkují také specifické proteiny jako je cerevisin (albumin), zymokasein (fosfoprotein) a glutathion. V buňkách se vyskytuje i značné množství volných aminokyselin především ve vakuolách. Sacharidy jednak tvoří buněčnou stěnu – glukán, manan – a jednak se nacházejí uvnitř buňky – glykogen, manan jako zásobní látky (Sugawara et al., 2004). Nukleové kyseliny jsou mimo jádra přítomné i v mitochondriích. Lipidy jsou v buňkách obsaženy jako tuky vázané v buněčné stěně nebo jako tuky volné v cytoplasmě ve formě tukových kapeček. Podstatnou část lipidické složky zaujímají složené tuky, především glykolipidy a fosfolipidy – lecitin a kefalín (Tosch et al., 2005). Z minerálních látek je nejvíce zastoupen P_2O_5 , vápník, hořčík, měď, mangan a zinek (Němec a Horáková, 2002).

Buněčná stěna kvasinek je pevná, odolná a elastická struktura, pro niž je typická odlišnost chemického složení od buněčné stěny rostlinných a bakteriálních buněk a tvorba jizev, jako trvalých struktur po pučení. Významnou roli sehrává buněčná stěna při shlukování buněk, rozpoznávání mezi buňkami opačného párovacího typu při pohlavním rozmnožování, sporulaci, zprostředkování kontaktu mezi patogenní kvasinkou a hostitelským organismem (Farkaš, 2003; Klis et al., 2006).

Tloušťka buněčné stěny se pohybuje v rozmezí 100–400 nm. Může se však lišit jak mezi, tak i uvnitř druhu. Nativní buněčná stěna představuje velmi složitý heterogenní polymer. Základní složky (glukán, manan, protein a chitin) tvoří až 90 % buněčné stěny. Množství lipidů je malé a nestálé. Ve stěně byla prokázána i přítomnost enzy-

and cultivation the yeast belongs to the most important eukaryotic model organisms. Number of heterologous proteins produced by yeast has risen with the development of genetic engineering.

Yeasts are heterotrophic eukaryotic organisms with rigid cell envelope. They can occur as a unicellular ellipsoid organism or in the form of elongated cells linked in filaments – pseudomycelium. The Czech name of yeast is based on the ability of the majority of yeast species to ferment monosaccharides and some of the disaccharides or trisaccharides. Occurrence of yeast is thus related to the materials containing sugars, mainly on the berry and stone-fruit plants, sugary crop plants, but also in the soil, water or intestinal tract.

Yeasts belong to the domain Eukarya, kingdom Fungi, but they do not form a single taxonomic or phylogenetic group. According to the mode of sexual reproduction, yeasts are classified in phyla *Ascomycota* – suc fungi, or *Basidiomycota* – club fungi. In some yeasts their sexual form of reproduction has never been observed – they are classified as *Deuteromycota* also known as „fungi imperfecti“, and form only a subsidiary group belonging to the phylum *Ascomycota*. Classification and nomenclature of yeast are subject to continuous changes given particularly by discovering of new sexual stages belonging in most cases to phylum *Ascomycota*. According to the hypothesis that yeast has originated as a reduced form of fungi, filamentous yeast-like fungi are considered to be evolutionary older than unicellular forms (Kalina and Váňa, 2005; Kocková-Kratochvílová, 1990).

2 YEAST CELL

Yeast cell is of eukaryotic type, containing various reaction areas, compartments, surrounded by membranes. Cell size ranges between 3–15 µm depending on genus and cultivation conditions. The shape of a yeast cell, a genus-specific characteristic, is given to a large extent by the mode of vegetative reproduction (budding, binary fission), and it may be to some extent affected by environment conditions, e.g. by the surface tension, nutrition media composition, redox potential, etc. (Kocková-Kratochvílová, 1957). The basic shape of a yeast cell is rotary ellipsoid with two possible variations – towards the round shape or towards the elongated to filamentous form (Kocková-Kratochvílová, 1957). Yeast can also change its shape during development. Cells of the genus *Trigonopsis* may have triangular shape depending on cultivation conditions (Šašek and Becker, 1969). Some yeasts form elongated cells that reproduce by budding on opposite poles and remain connected in long pinched filaments – pseudomycelia. Blastospores (short ellipsoidal cells) are formed on particular parts of pseudomycelium of, e.g., genus *Candida* (Vázquez-Tsuji et al., 2005). Yeasts of genera *Candida* and *Rhodotula* may form so-called true mycelium – a filament arising by binary fission of elongated cells (Berman, 2006).

Chemical composition of yeast cells depends on species, strain, physiological state, conditions of cultivation, nutrition medium and on the age of the culture. The main component of yeast protoplasm is water (65–80 %). Dry weight of *Saccharomyces cerevisiae* cells contains commonly: nitrogen compounds 45–60 %, carbohydrates 15–37 %, lipids 2–12 %, mineral compounds 6–12 %, and growth factors and some vitamins (Bendová and Kahler, 1981).

Yeast produces specific proteins cerevisin (albumin), zymocasein (phosphoprotein) and glutathione. The cells contain considerable quantities of free amino acids, located mainly in vacuoles. Cell saccharides – glucan, mannan – partly form the cell wall and partly occur inside the cell – glycogen and mannan as reserve substances (Sugawara et al., 2004). Nucleic acids are present in nucleus and also in mitochondria. Lipids exist in cells in the bound form in cell wall or as fat drops in the cytoplasm. Lipids are composed to a large extent by glycolipids and phospholipids – lecithin and cephalin (Tosch et al., 2005). Mineral compounds contained in the cell include P_2O_5 , calcium, magnesium, copper, manganese and zinc (Němec and Horáková, 2002).

The yeast cell wall is a rigid, resistant and elastic structure with chemical composition distinct from the plant and bacterial cell wall. Yeast cell wall also contains scars as a permanent consequence of budding. Cell wall plays a crucial role in cell agglutination, recognition of opposite mating type of cells during sexual reproduction, in cell sporulation, and in mediating the contact between pathogenic yeast and host organism (Farkaš, 2003, Klis et al., 2006).

The thickness of the cell wall ranges from 100 to 400 nm. It can, however, be species or strain specific. Native cell wall represents a complex heterogeneous polymer composed from up to 90 % of

mů (invertasa, fosfatasa, proteasy, atd.). Chitin je na povrchu buněčné stěny rozložen nerovnoměrně. Nejvíce se nachází v oblasti žívej. Jizvy jsou terčovitě útvary, které jsou dobře barvitelné fluorescenčními barvivami a které zůstávají na povrchu buňky v místě, kde se oddělil pupen (Rose a Harrison, 1991).

Některé kvasinky (např. *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Pichia*) mohou tvořit i pouzdro. Pouzdro se skládá z polysacharidů, které tvoří síť radiálně orientovaných mikrofibril vycházejících od buněčné stěny. Polysacharidy vždy obsahují manosu a glukuronovou kyselinu, další sacharidy (např. xyloza, galaktosa, glukosa) jsou u různých druhů kvasinek zastoupeny v odlišných poměrech. Pouzdro má zřejmě velký podíl na virulenci patogenních kvasinek (Eisenman et al., 2007). Opouzdřené buňky obvykle vytváří slizovité kolonie.

Vzhled kolonií je různý a do jisté míry je druhově a rodově specifický. Závisí na složení živné půdy, kultivačních podmínkách (teplota, vlhkost, vyčerpání živin, vliv metabolitů), tvaru a velikosti buněk, tvorbě spor a na změně genetické informace následkem spontánních mutací. Nejčastěji jsou kolonie označovány jako hladké, drsné nebo slizovité. Některé kvasinky (např. *Cryptococcus*) tvoří množství mimobuněčného polysacharidu slizovité konzistence, který obaluje buňky jako pouzdro. Kultivací v čistých kulturách se tvorba slizu snižuje a časem se může dokonce vytratit úplně (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Vůči vnějšímu prostředí se kolonie zdají být méně rezistentní a méně komplexní než biofilm vytvářený v přirozených podmínkách. Kolonii je možné považovat za jakýsi přechod mezi biofilmem a nechráněnou jednotlivou buňkou.

Kolonie jsou modelem pro studium interakcí a signálů mezi mikroorganismy uvnitř mnohobuněčného společenstva. Vzhled laboratorních a čerstvě izolovaných divokých kmenů z prostředí se velmi liší. Laboratorní kmeny *Saccharomyces cerevisiae* obvykle tvoří hladké kolonie, zatímco čerstvě izolované divoké kmeny z prostředí vytvářejí kolonie „vločkovitě strukturované“. Elektronová mikroskopie a biochemické testy dokázaly, že buňky uvnitř „vločkovitých“ kolonií jsou spojeny mimobuněčnou matrix, která má funkci jakési kostry. Tato matrix pravděpodobně obsahuje vysokomolekulární protein nebo komplex proteinů. U hladkých kolonií žádný podobný materiál pozorován nebyl. Přizpůsobení organismu na laboratorní podmínky je dáno značně změněnou expresí asi 320 genů a ztrátou mimobuněčné matrix. Hlavní pozorované změny se týkají metabolismu cukrů a vitamínů, buněčné stěny, buněčného cyklu a polarity (Kuthan et al., 2003). Na přechod od „vločkovité“ ke hladké formě má také vliv potlačení genu *aqy1*, který kóduje aquaporiny. To vede ke změnám v propustnosti vody a povrchových vlastnostech buněk. U většiny laboratorních kmenů dochází k mutaci genu *aqy1* a tyto kmeny potom tvoří hladké kolonie. Adaptace na laboratorní podmínky je spojována i s chromatinovou přestavbou, s histonovými deacetylasy (Hda1 a Rpd3) a Sir2, který tlumí specifické oblasti na chromosomu. Růst ve vločkovitém uspořádání zřejmě přináší kvasinkám výhody za nepříznivých podmínek, protože při růstu na bohatém médiu v podmínkách *in vitro* se tato struktura nevytváří (Palková, 2004).

■ 3 METABOLISMUS KVASINEK

Metabolismus je souhrn látkových přeměn, které se odehrávají jak v kvasinkových buňkách samotných, tak i v prostředí, kde rostou a množí se. Pro mikroorganismy je charakteristická vysoká intenzita metabolismu, která je silně ovlivněna vnějšími podmínkami. Dostačující přísun živin, vhodná teplota a pH prostředí vedou k intenzivnímu metabolismu a rychlé syntéze buněčné hmoty. Ta se za optimálních podmínek u *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Candida utilis* zdvojnásobí už zhruba za 2 hodiny (Vodrážka, 2006).

Jako zdroj uhlíku a energie kvasinky využívají především mono- a disacharidy, méně pak oligo- či polysacharidy. Jako zdroj uhlíku mohou být využity i další látky – glycerol, laktát, ethanol, methanol, alkyany atd. Zpracování zdrojů uhlíku a energie probíhá u většiny kvasinek za aerobních podmínek glykolysou a navazujícím Krebsovým cyklem. Avšak u převážně fermentujících kvasinek je energie tvořena v průběhu kvašení. Při distribuci pyruvátu vznikajícího mezi respirační a fermentační reakcí je důležitá aktivita pyruvátdehydrogenasy, která se nachází v mitochondriích a produkuje acetyl-CoA pro vstup do Krebsova cyklu, a cytoplasmatické pyruvátdekarboxylasy, která napomáhá vzniku acetaldehydu a tím i ethanolu (Pronk et al., 1996). Produkty metabolismu kvasinek mohou být nejen CO₂, etanol, H⁺, ale i glycerol, acetát, sukcinát atd. U různých kmenů lze poměry produktů ovlivnit kultivačními podmínkami.

glucan, mannan, proteiny a chitin. Lipids can also be present in low and unstable amount. The presence of enzymes (invertase, phosphatase, proteases, etc.) in cell wall was also observed. Chitin distribution on the surface of the cell wall is uneven, with higher concentration in the areas of bud scars. Scars are crater-like formations that are located on the mother cell surface after the newly emerged daughter cell (bud) separates. The scars are easily stained with fluorescent dyes (Rose and Harrison, 1991).

Some yeasts (e.g. *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Pichia*) may form a capsule composed of polysaccharides arranged in a network of radially orientated microfibrils ensuing from the cell wall. Polysaccharides always contain mannose and glucuronic acid. Other saccharides (e.g. xylose, galactose, glucose) are present in various ratios depending on yeast species. The presence of the capsule may strongly affect the virulence of pathogenic yeast (Eisenman et al., 2007). Capsulated cells mostly form slimy colonies.

Appearance of colonies varies and is to some extent species and genus specific. It depends on the composition of nutrition media, incubation conditions (temperature, humidity, nutrient depletion, effect of metabolites), shape and size of the cells, spore formation and genetic changes induced by spontaneous mutations. Yeast colonies are commonly described as smooth, rough or mucilaginous. Some yeasts (e.g. *Cryptococcus*) form extracellular slimy polysaccharide that is covering the cell as a capsule. Cultivation of such yeast in a pure culture leads to the reduction or even cessation of slime production (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Colonies appear to be less resistant to external environment and less complex than biofilm formed in natural conditions. Colony may be considered as a transition between biofilm and unprotected single cell.

Yeast colonies are used as a model for the study of interactions and signals among microorganisms in multicellular communities. The appearance of laboratory colonies strongly differs from that of colonies of isolated wild strains from the environment. Laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* commonly form smooth colonies, while colonies of new-isolated wild strains have “fluffy structure”. The cells inside “fluffy colonies” are connected by extracellular matrix that acts as a skeleton, as was demonstrated by electron microscopy and biochemical tests. The matrix probably contains high-molecular proteins or protein complex. Such material has never been observed in smooth colonies. Adaptation of the microorganism to the laboratory conditions brings about loss of the matrix and altered expression of about 320 genes. In general, the observed changes relate to the metabolism of carbohydrates and vitamins, cell wall, cell cycle and polarity (Kuthan et al., 2003). Transition from “fluffy” to smooth form is also affected by suppression of the *aqy1* gene encoding aquaporins. The water permeability and surface properties of cell are then altered. Gene *aqy1* is suppressed in most of the laboratory strains and they are thus forming smooth colonies. Adaptation to laboratory conditions is also connected with chromatin remodeling, histone deacetylases (Hda1 a Rpd3) and Sir2 with silencing activity. The growth in “fluffy” colonies seems to be important for yeast to resist adverse conditions since growth in rich media in *in vitro* conditions is not accompanied by the formation of fluffy structure (Palková, 2004).

■ 3 YEAST METABOLISM

Metabolism is a set of chemical reactions that take place within the cells and in the environment where they grow and reproduce. Metabolism supplies the cell with building material and energy that are necessary for cellular processes. Microorganisms possess intensive metabolism that is strongly affected by external conditions. Sufficient supply of nutrients, proper temperature and pH lead to intensive metabolism and rapid synthesis of cell mass that, in *Saccharomyces cerevisiae* or *Candida utilis* under optimal conditions, can double within 2 hours (Vodrážka, 2006).

As a source of carbon and energy, yeast uses above all monosaccharides and disaccharides, and to a smaller extent oligosaccharides and polysaccharides. Glycerol, lactic acid, ethanol, methanol, alkanes, etc., can also serve as sources of carbon. Sources of carbon and energy are in most yeasts converted aerobically by glycolysis and citric acid cycle. However, in yeast with predominantly fermentative metabolism the energy is formed during the fermentation process. Activities of two enzymes are pivotal for the distribution of pyruvate generated between respiratory and fermentative reaction: mitochondrial pyruvate dehydrogenase (formation of acetyl-CoA for

Glykolysa je hlavní cestou pro odbourávání sacharidů. Reakce probíhají v cytoplasmě a jsou katalyzovány enzymy, které nejsou vázány na buněčné struktury. Prvním krokem je přeměna glukosy přes fruktosa-1,6-bisfosfát za spotřeby 2 ATP na vhodný donor atomů vodíku, glyceraldehyd-3-fosfát. Následuje jeho dehydrogenace, kdy je vodík odebírán NAD^+ , a vznik pyrohroznové kyseliny. Čistý zisk z jedné molekuly hexosy jsou 2 ATP (Němec a Horáková, 2002).

Při aerobní respiraci je substrát oxidován na CO_2 a H_2O cyklem seřazených reakcí, jimiž jsou postupně odebírány vodíky výchozí látky acetyl–CoA, který vzniká oxidační dekarboxylací pyrohroznové kyseliny za přítomnosti CoA. Cyklus bývá často označován jako Krebsův cyklus, cyklus trikarbonových kyselin či jako citrátový cyklus a slouží nejen k terminální oxidaci substrátů, ale podílí se svými meziprodukty i na procesech biosynthesy. Jde tedy o typický amfibolický děj. Celkový výtěžek aerobní respirace je 36 ATP. Fakultativně anaerobní kvasinky využívají raději aerobní respiraci, protože je energeticky mnohem výhodnější než kvašení (Němec a Horáková, 2002; Vodrážka, 2006).

Při nadbytku může být organický substrát, který slouží jako zdroj energie, pouze částečně oxidován za vzniku velkého množství organického produktu. Toho se průmyslově využívá při aerobní kvasné výrobě některých organických kyselin, např. citrónové kyseliny u *Yarrowia lipolytica* (Kamzolova et al., 2007).

Při kvašení nedochází k úplnému rozkladu substrátu jako u aerobní respirace, proto i množství získané energie je menší (2 ATP). Fermentace je shodná s EMP–dráhou až do vytvoření pyrohroznové kyseliny, ta je dále dekarboxylována pyruvátdekarboxylasou na acetaldehyd, který je redukován na ethanol.

Na redukcí acetaldehydu se podílí alkoholdehydrogenasa I (AdhI), která se nachází v cytoplasmě. U *Saccharomyces cerevisiae* byly zjištěny ještě další typy, které se účastní především oxidace ethanolu. AdhII je lokalizována v cytoplasmě a při nízké buněčné koncentraci ethanolu může být využita i při kvašení. Dehydrogenasy AdhIII a AdhIV se nacházejí v mitochondriích, AdhV v cytoplasmě, ale lokalizace AdhVI a AdhVII není přesně známa. AdhVI je striktně specifická k NADPH a je aktivní k řadě substrátů, které obsahují alifatické a aromatické primární alkoholy a aldehydy (Smidt et al., 2008).

4 VYUŽITÍ KVASINEK

Kvasinky jsou celosvětově jedním z průmyslově nejvyužívanějších mikroorganismů. Jsou nezastupitelné v potravinářském a farmaceutickém průmyslu a v některých oblastech vědy, techniky i medicíny. Mohou být využity jako biologické modelové systémy pro studium obecných regulací metabolismu a genetiky eukaryotických buněk. *Saccharomyces cerevisiae* je z tohoto hlediska nejvíce prodávanou kvasinkou. Kvasinky bývají označovány jako nejstarší „domestikovaný“ organismus, který je po tisíce let používán k výrobě alkoholických nápojů a kynutého pečiva. Podstatná je také produkce biologicky aktivních látek, biodegradace aktivita a výroba potravinářské a krmné biomasy. V současné době nacházejí kromě tradičních technologií stále větší uplatnění i v řadě dalších aplikací (např. výroba organických kyselin, vitaminů, atd.). Geneticky modifikované kvasinky produkují farmakologické preparáty pro prevenci i léčbu onemocnění. V budoucnu lze díky technikám rekombinantní DNA očekávat další rozvoj využití kvasinek.

4.1 Pivovarské kvasinky

Při kvašení piva se využívá tzv. spodních a svrchních kvasinek a jejich schopnosti přeměny jednoduchých cukrů (glukosa), disacharidů (maltosa) a některých trisacharidů (maltotriosa) na ethanol a oxid uhličitý anaerobním kvašením. Spodní kvasinky se v konečné fázi shlukují ve vločky (flokulují) a sedimentují na dně kvasné nádoby. Po stáhnutí piva se properou studenou vodou a po promytí se znovu použijí pro další fermentaci. Proces kvašení probíhá při teplotě 6–12 °C (Basařová et al., 2010; Boulton a Quain, 2001).

Svrchní kvasinky jsou po skončení kvašení vynášeny na povrch fermentační kapaliny, kde tvoří hustou pěnu. Snášejí vyšší teploty než kvasinky spodní, mohou kvasit v rozmezí 10–25 °C. Jako svrchní kvasinky bývají označovány *Saacharomyces cerevisiae*, jako spodní *Saccharomyces pastorianus*. Protože však problematika nomenklatury spodních pivovarských kvasinek není zcela dořešena, a je možné, že druh *S. pastorianus* bude převeden spíše na druhový komplex (Rainieri et al., 2006), je doporučováno prozatím zachovat v technologii zažité a srozumitelné pojmenování spodních kvasinek *Saccharomyces carlsbergensis* (Matoušková a Šavel, 2007).

the citric acid cycle) and cytoplasmic pyruvate decarboxylase, leading to the formation of acetaldehyde and thereby of ethanol (Prunk et al., 1996). Products of yeast metabolism include CO_2 , ethanol, H^+ , and also glycerol, acetic acid, succinic acid, etc. Product ratio can be influenced by cultivation conditions.

Glycolysis is the main pathway for the conversion of saccharides. Glycolytic reactions take place in cytoplasm and are catalyzed by enzymes that are not bound to cell structures. The first step in glycolysis is conversion of glucose via fructose 1,6-bisphosphate into glyceraldehyde 3-phosphate (donor of hydrogen atoms). This reaction consumes 2 molecules ATP. Glyceraldehyde 3-phosphate is then dehydrogenated (hydrogen is used to reduce NAD^+) and pyruvic acid is formed. Net profit from one molecule of hexose is 2 molecules ATP (Němec and Horáková, 2002).

During aerobic respiration the substrate is oxidized into CO_2 and H_2O via a cycle of chemical reactions removing hydrogen atoms from acetyl–CoA that is formed by oxidative decarboxylation of pyruvic acid in the presence of CoA. The citric acid cycle (Krebs cycle) is a typical amphibolic pathway because it participates in both catabolism and anabolism. Net profit of aerobic respiration is 36 ATP molecules. Facultatively aerobic yeast prefers aerobic respiration since it is energetically more efficient than fermentation (Němec and Horáková, 2002; Vodrážka, 2006).

Organic substrates in excess quantity can be oxidized incompletely to form high amounts of organic products. This can be used in the industrial production of organic acids, e.g. citric acid formed by *Yarrowia lipolytica* (Kamzolova et al., 2007).

During fermentation the substrate is not completely broken down like in aerobic respiration, therefore the energy profit is lower (2 ATP). The product of glycolysis, pyruvate, is decarboxylated to acetaldehyde that is consequently reduced to ethanol. Reduction of acetaldehyde into ethanol is catalyzed by alcohol dehydrogenase I (AdhI) that is situated in cytoplasm. Other types of Adh found in *Saccharomyces cerevisiae* are involved mainly in ethanol oxidation. AdhII is located in cytoplasm and may act during fermentation at low intracellular concentration of ethanol. Dehydrogenases AdhIII and AdhIV are mitochondrial enzymes, AdhV is found in cytoplasm, location of AdhVI and AdhVII is not known. Alcohol dehydrogenase AdhVI is strictly specific for NADPH and exerts activity towards a number of substrates that include aliphatic and aromatic primary alcohols and aldehydes (Smidt et al., 2008).

4 USES OF THE YEAST

Yeast is one of the most widely used industrial microorganisms worldwide. It is irreplaceable in food and pharmaceutical industry and in some research, technical and medical areas. It can be used as a model system for the study of general regulations of metabolism and genetics of eukaryotic cell. From this point of view *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most studied yeasts. Yeast is also considered as the oldest “domesticated” organism used for thousands of years for the production of alcoholic beverages and raised bread. Production of biologically active compounds of yeast, its biodegradation activity and production of food and fodder biomass is also of great importance. In addition to the traditional technologies, yeast finds an ever increasing application in a number of other fields (production of organic acids, vitamins, etc.). Genetically modified yeast can produce pharmacological formulas for both prevention and treatment. Recombinant DNA techniques are likely to bring further development of yeast uses in the future.

4.1 Brewer's yeast

Beer production is based on the use of lager and ale yeast and their ability to covert monosaccharides (glucose), disaccharides (sucrose) and some trisaccharides (maltotriose) to ethanol and CO_2 . At the end of fermentation the lager yeast forms flakes (floculates) and sediments at the bottom of the fermentation vessel. Fermentation is performed at temperatures 6–12 °C (Basařová et al., 2010; Boulton and Quain, 2001).

After the termination of fermentation, ale yeast rises to the surface of the fermentation broth and form thick foam. In comparison with lager yeast they tolerate higher temperature, thus the fermentation may take place within the 10–25 °C range. Ale yeast are classified as *Saccharomyces cerevisiae*, lager yeast belong to the species *Saccharomyces pastorianus*. Since the nomenclature of lager yeast has not been conclusively established and it is possible that the species

Pivovarské kvasinky mají zpravidla oválný až kulatý tvar. Důležité je, aby kultura měla vyrovnaný tvar, stabilní vlastnosti, omezenou sporulaci a především pohlavní rozmnožování, které je největším zdrojem proměnlivosti. Rozsah laboratorního posuzování vlastností kvasnic záleží na účelu kontroly. Sleduje se především schopnost zkvašování mladiny, flokulace, sedimentace a vliv na organoleptické vlastnosti piva. Jako vedlejší kvasné produkty, které dotvářejí chuť a aroma piva, se uvádějí především diacetyl, alifatické alkoholy (isoamylalkohol), estery (ethylacetát, ethylhexanoát, isoamylacetát), aldehydy a mastné kyseliny. Při podrobnější charakteristice se u kmenů ověřuje míra zkvašování rafinósy, tolerance k ethanolu, osmofilie, tendence k tvorbě pseudomycelia, vzhled kolonií atd. Na produkci látek a tedy i na kvalitu piva má velký vliv fyziologický stav a stáří kultury (Bendová a Kahler, 1981; Janderová a Bendová, 1999).

Velký význam má při kvašení flokulace, ta nesmí proběhnout, dokud není spotřebován substrát do přípustné zbytkové koncentrace a musí proběhnout brzy po skončení kvašení především pro zamezení autolýsy kvasinek. Flokulace je reverzibilní schopnost kvasinek shlukovat se, tvořit větší celky (vločky) a následně usazeninu. U spodních kvasinek se projevuje tvorbou pevného sedimentu na dně. U svrchních kvasinek souvisí se shlukováním i pevnost kvasničné „deky“ na povrchu mladého piva. Mechanismus procesu flokulace zatím není zcela uspokojivě objasněn (Stratford, 1992).

U spodních kvasinek je flokulace řízena lektinovým mechanismem, vyžaduje vápník, je inhibována manosou a jinými cukry, ale není ovlivňována ethanolom. Začátek flokulace souvisí s objevením „aktivního“ lektinu na povrchu buněk a se snížením koncentrace cukru v roztoku. U svrchních kvasinek flokulace neprobíhá stejným mechanismem, není inhibována manosou a nevyžaduje přidání vápníku. Nástup flokulace je ovlivněn změnou buněčného povrchu a zvýšením koncentrace ethanolu. Jako jediný důkaz pro adhesní mechanismus stačí přídavek malého množství vápníku (Dengis et al., 1995).

Na flokulaci má vliv řada faktorů: kmen kvasinek (genetické, fyziologické vlastnosti, metabolismus), složení živného média a růstové podmínky (přítomnost anorganických iontů, ethanolu, živin, teplota, pH, aerace, obsah rozpuštěného O_2). Vločky se mohou skládat až z tisíců buněk a protože buňky nevykazují Brownův pohyb, má míchání při flokulaci velký význam (van Hamersveld et al., 1997; Verstrepen et al., 2003).

Flokulace je geneticky podmíněná vlastnost řízená skupinou genů *FLO*, jejichž produkty *FLOp* jsou soustředěny na povrchu buňky. Hydrofóbní C–konec *FLOp* je nezbytný pro ukotvení na buněčném povrchu a pro mezibuněčné interakce. Naproti tomu N–konec působí jako reakční doména (Jin a Speers, 1998). Transkripční aktivita genů je ovlivněna živinami stejně tak jako stresovými faktory. Flokulace je tedy závislá na faktorech, které ovlivňují stavbu buněčné stěny a morfologii buňky (Verstrepen et al. 2003). Jako inhibitory flokulace se uvádějí především maltosa a manosa, méně účinné jsou sacharosa a glukosa, neúčinné jsou galaktosa a fruktosa. Od toho se pak odvozuje dělení fenotypů, *Flo1* fenotyp je citlivý pouze k manose, *NewFlo* fenotyp je kromě manózy citlivý i ke glukose a maltose (Stratford and Assinder, 1991). Flokulující kvasinky se ale také mohou rozlišovat na *MS* (citlivé k manose), *GMS* (citlivé k manose a glukose) a *MI* (necitlivé k manose) (Masy et al., 1992).

Flokulace je založena na interakci proteinů buněčné stěny a je závislá na iontech vápníku. Dříve se předpokládalo, že vápenaté ionty tvoří můstky mezi flokulujícími buňkami a negativním nábojem na buněčném povrchu, k udržení této struktury je zapotřebí vodíkových vazeb. V současné době je spíše uznávána lektinová hypotese. Charakteristický povrchový protein zymolektin, který je přítomen u flokulujících kvasinek, váže manózoové zbytky mananových molekul na povrch sousední buňky (Miki et al., 1982). Výsledky z poslední doby naznačují, že vápenaté ionty jsou zapojeny do vazby s uhlovodíky spíše přímo než nepřímo, kdy by měly udržovat aktivní konformaci flokulinu (Veelders et al., 2010). Komplexnost a diverzita pivovarských kvasinek vedou pravděpodobně k různým mechanismům flokulace, které jsou závislé na kmeni kvasinek a na podmínkách prostředí (Speers et al., 1993).

4.2 Vinařské kvasinky

Vinařské kvasinky mají protáhlé elipsoidní buňky a jsou tolerantní k SO_2 (zasíření moštu). Kvašení probíhá až do teploty 25 °C po dobu 7–14 dnů. Oproti pivovarským kvasinkám jsou odolnější k alkoholu. Do moštu se dostávají buď s povrchu bobulí (spontánní kvašení) nebo přidáním čisté kultury ušlechtilých kvasinek (čisté kvašení). Ve vinařství se uplatňuje především *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces be-*

S. pastorianus will be converted into a species complex (Rainieri et al., 2006), it is recommended to retain the name *Saccharomyces carlsbergensis*, the name commonly accepted by technologists (Matoulková and Šavel, 2007).

Brewer's yeast cells are of an oval to round shape. Production strain should have balanced shape, stable properties, and limited sporulation and especially sexual reproduction which is the main source of yeast variability. Laboratory testing of yeast properties is aimed at wort attenuation, flocculation, sedimentation and organoleptic characters of final beer. The fermentation by-products that form taste and aroma of beer include particularly diacetyl, aliphatic alcohols (isoamylalcohol), esters (ethylacetate, ethylhexanoate, isoamylacetate), aldehydes and fatty acids. Additional specific test may be performed – rate of raffinose fermentation, tolerance to alcohol, osmophilia, tendency to pseudomycelium formation, colony appearance, etc. Production of flavor compounds and thus the final beer quality strongly depends on the physiological state and age of the production yeast strain (Bendová and Kahler, 1981; Janderová and Bendová, 1999).

Yeast flocculation is of great importance for the brewing industry. However, the yeast cells should not flocculate before the wort is completely attenuated to the required degree, and the flocculation should occur soon after the end of fermentation to avoid yeast autolysis. Flocculation is a reversible ability of yeast to adhere, form clumps (flocs) and consequently a sediment at the bottom of fermenting vessel (lager yeast). In ale yeast the agglutination relates with the consistency of “covers” on the surface of green beer. The mechanism of flocculation has not yet been conclusively established (Stratford, 1992).

Flocculation of lager strains is governed by a lectin-mediated mechanism, requires calcium, is inhibited by mannose and some other saccharides and is not influenced by ethanol. The onset of flocculation is related to the appearance of “active” lectins at the cell surface and is marked by a decrease in sugar concentration in the solution. Flocculation of the top fermenting strains is not inhibited by mannose and does not require the addition of calcium. The onset of flocculation is affected by the cell surface changes and increase in ethanol concentration. The only evidence for an adhesin-mediated mechanism of flocculation is a requirement for a small amount of calcium (Dengis et al., 1995).

Flocculation can be affected by yeast strain (genetics, physiological characters, metabolism), composition of nutrition media, and cultivation conditions (presence of inorganic ions, ethanol, nutrients, temperature, pH, aeration, dissolved O_2). Yeast flocs may be comprised of thousands of cells that do not exhibit Brownian motion, and stirring during flocculation is thus of a great importance (van Hamersveld et al., 1997; Verstrepen et al., 2003).

Flocculation is a genetically controlled inducible characteristic under the control of *FLO* genes encoding cell wall proteins *FLOp*. The hydrophobic C–terminus of *FLOp* is necessary for both the anchoring of *FLO1p* at the cell surface and for the cell–cell interactions. The N–terminal region corresponds to the reacting domain at the cell surface (Jin and Speers 1998). The transcriptional activity of the *FLO* genes is influenced by the nutritional status of the yeast cells as well as other stress factors. Flocculation is also controlled by factors that affect cell wall composition or morphology (Verstrepen et al., 2003). Maltose and mannose were found to be the most effective inhibitors of flocculation whereas sucrose and glucose are less effective and galactose and fructose are ineffective. Two distinct phenotypes of strains have been classified according to sugar specificity: the *Flo1* phenotype which is mannose sensitive only and the *NewFlo* phenotype which is sensitive to glucose and maltose in addition to mannose (Stratford and Assinder, 1991). However, some researchers also classified flocculent yeast strains into three groups as *MS* (mannose sensitive), *GMS* (glucose and mannose sensitive) and *MI* (mannose insensitive) (Masy et al., 1992).

Flocculation is based on the interaction of cell wall proteins and is dependent on calcium ions. It was assumed that calcium ions form bridges between flocculating cells by binding to negative charges on the cell surface. Such bridges may be stabilized by hydrogen bonding between carbohydrate hydrogen atoms and hydroxyl groups. Later the lectin hypothesis has become a more convincing. It proposes that surface proteins zymolektins present on flocculent yeast cells bind to mannose residues of mannan molecules on neighboring cell surfaces (Miki et al., 1982). Calcium ions are believed to act indirectly by maintaining a correct conformation of the flocculin (Veelders et al., 2010). The complexity and diversity of brewer's yeast are the cause of various mechanisms of flocculation that depend on yeast strain and environmental conditions (Speers et al., 1993).

ticus (produkce buketních látek) či *Saccharomyces oviformis*, která se také označuje jako „dokvásecí“ kvasinka a je tolerantnější k alkoholu. Autolýza kvasinek přispívá k buketu vína (Romano et al., 2003).

Pro každou vinařskou oblast je typická jiná mikroflóra na hroznech, která se odráží v buketu přirozeně fermentovaného vína. Kvasinky na bobulích se liší jak mezi většími oblastmi, tak i mezi vinicemi uvnitř regionu (Pennisi, 2005). I za standardních laboratorních růstových podmínek se transkripční profil divokých vinařských a laboratorních kmenů kvasinek výrazně liší v transkripci několika genů, které jsou spojovány s charakteristickými vlastnostmi vinařských kvasinek. Pokusy ukázaly, že vinařské kmeny jsou více „kolonizovány“ transposony než kmeny laboratorní. Transposony by mohly být použity jako vhodný prostředek pro rozlišení průmyslových kmenů na molekulární úrovni (Hauser et al., 2001). Složení mikroflory rovněž ovlivňuje, zda byl hrozen napaden plísní či nikoliv. Při fermentaci hroznů napadených plísní *Botrytis* působí ze začátku slabě fermentující kvasinky (*Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Clavispora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Candida* atd.), které jsou později nahrazeny rodem *Saccharomyces* (Nisiotou et al., 2007).

Vliv na výsledné aroma vína mají použité kmeny kvasinek a jejich schopnost produkovat těkavé thioalkoholy a další metabolity fermentace, kterými se dotváří výsledná chuť. Výběr vhodného kmene kvasinek tedy nabízí určitou možnost, jak změnit chuť vína (Swiegers et al., 2009).

4.3 Pekařské kvasinky

Stejně jako u pivovarských kvasinek se požaduje u pekařských kvasinek vyrovnanost tvaru (vejčitý či krátce elipsoidní), velikosti buněk a stálost technologických vlastností. Ty se získaly selekcí kmenů s poškozenou schopností sporulace. Pekařské droždí je připraveno aerobní fermentací okyselených melasových zápar s přidanými amonnými soli a fosfátem. Zápary jsou silně provzdušňovány a aerobní metabolismus je také zajišťován opakovanými přidávkami čerstvého záparu. Kvasinky se potom rychleji množí i v prostředí s nízkou koncentrací cukru. Přesto se však produkuje malé množství ethanolu. Kvasinky by neměly aglutinovat a autolysovat, což je velmi důležité pro delší trvanlivost droždí. Při snížené koncentraci glukosy v živném médiu mohou pekařské kvasinky tvořit rozsáhlý biofilm a pevně se vázat na podložku (Šilhánková, 2002). Obsah lipidů, sterolů a fosfolipidů má rozhodující vliv na odolnost kvasinek ke zmraznutí (Gélinas et al., 1991).

Pekařské kvasinky mohou mít také terapeutický význam. Alkoholový extrakt se po léta užívá jako podpora léčby hemeroidů, popálenin a různých poranění. Tento extrakt obsahuje tři stresové proteiny (superoxid-dismutasa, ubiquitin a HSP 12) a protein II pro vazbu acyl-CoA. V kultuře myších buněk, která byla vystavena působení extraktu, okamžitě vzrostla buněčná respirace a kinasová aktivita (Schlemm et al., 1999). Jako běžný dietní antigen jsou pekařské kvasinky užívány u pacientů s vředovitými záněty tlustého střeva. Titry protilátek k *S. cerevisiae* se zdají být specifické ke Crohnově chorobě, což by mohlo být významné při odlišení této nemoci od podobných infekcí. Není ale vyloučena možnost druhotné infekce neznámými agens, které způsobují vysokou koncentraci těchto protilátek (Main et al., 1988).

4.4 Lihovarské kvasinky

Při výrobě lihu se nejčastěji využívají vyšlechtěné kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou přizpůsobeny různým lihovarským záparům, především melase a škrobnatým substrátům. Je pro ně typická velká tolerance k ethanolu a teplotě (až 30 °C), vysoká rychlost kvašení (24–48 hod), vysoký výtěžek na jednotku spotřebovaného substrátu a malé množství vedlejších produktů. Kvasinky by neměly aglutinovat a sedimentovat. Nejsou schopny zkvašovat škrob, pentosu a laktosu (Tvrdouň a Bálašová, 1986).

V současné době se pro výrobu lihu používá mnohodoruhové mikrobiální společenstvo, které obsahuje kvasinky, bakterie i plísně (*Candida* sp., *Kluyveromyces*, *Monilia*, *Fusarium*, *Clostridium*), nebo se hydrolysuje celulosu či lignocelulosový komplex a z uvolněných sacharidů (hexosy a pentosy) se pak za anaerobních podmínek vhodným mikroorganismem produkuje ethanol. Nevýhodou využití mikrobiálního společenstva je tvorba vedlejších produktů, které lih znehodnocují. Kvašení většinou probíhá pomaleji (Flores et al., 2000; Rao et al., 2008).

Netradiční kvasinky, které se průmyslově využívají k produkci ethanolu nebo k tomu mají předpoklady, patří do rodů *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Rhodotula*, *Zygosaccharomyces*, *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia* a *Cryptococcus*. Tyto kvasinky zkvašují xylosu, výtěžek ethanolu je 0,12–0,38 g na 1 g xy-

4.2 Winery yeast

Winery yeast has elongated cells and is tolerant to SO₂ (grape juice sulfuration). Fermentation takes place at temperatures up to 25 °C for the period of 7–14 days. Winery yeast exhibits higher tolerance to alcohol compared to the brewer's yeast. Yeast is introduced to the grape juice either from the surface of grapes (spontaneous fermentation) or by pitching the juice with the pure culture of production yeast (pure fermentation). Yeast used in wine making includes the species *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces beticus* (production of bouquet compounds) or *Saccharomyces oviformis*, that is called “final fermentation” yeast with higher tolerance to alcohol. Yeast autolysis contributes to the bouquet of wine (Romano et al., 2003).

Different strains found on grapes from different vineyards are responsible for the distinctive bouquets of naturally fermented wines. The yeast found on grapes varies significantly between regions and also from vineyard to vineyard within a region. (Pennisi, 2005). Under normal laboratory conditions the transcription profiles of wild winery yeast and laboratory strains differ in a number of genes that are related to the typical properties of winery strains. The experiments showed that winery yeasts are more colonized with transposons than laboratory yeast. Transposons could be used as a reliable tool for differentiation of industry yeast on the molecular level (Hauser et al., 2001). Composition of grape microflora is also influenced by the presence of molds. Weakly fermenting yeast species (*Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Clavispora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Candida* atd.) are engaged at the beginning of fermentation of *Botrytis*-affected grape must and are later substituted by the genus *Saccharomyces* (Nisiotou et al., 2007).

Winery yeast and their ability to produce volatile thioalcohols and other flavor-active compounds are essential for final aroma of wine. Selection of production strain thus provides the possibility to alter the taste of wine (Swiegers et al., 2009).

4.3 Baker's yeast

Cell shape uniformity (oval or ellipsoidal) and stability of technological properties is required in baker's yeast similarly as it is for brewer's yeast. Baker's yeast was obtained by the selection of strains with lowered sporulation ability. Baker's yeast is made by aerobic fermentation of acidified molasses mash adjusted with ammonium salts and phosphate. The mash is heavily aerated and aerobic metabolism of the yeast is also ensured by the repeated additions of a fresh mash. The yeast then reproduces rapidly even in an environment with low concentration of salts. However, a low concentration of alcohol is produced. Baker's yeast should not agglutinate and should not be liable to autolysis otherwise its longevity would be affected. In media containing low concentration of glucose baker's yeast can form biofilm and bind firmly to the base (Šilhánková, 2002). Cell content of lipids, sterols and phospholipids is a determining factor of resistance of the yeast to freezing (Gélinas et al., 1991).

Baker's yeast is also of a therapeutic importance. Alcoholic extracts have been used for years for the treatment of hemorrhoids, burns, and wounds. The extract contains three stress proteins (superoxide dismutase, ubiquitin, and protein HSP 12) and acyl-CoA binding protein II. Immediate increase in cellular respiration and protein kinase activity in cells of mice model were observed on exposure to the extract (Schlemm et al., 1999). Baker's yeast is used as a common diet antigen for patients suffering from inflammatory bowel disease. Titres of antibodies to *S. cerevisiae* seem to be specific to Crohn's disease; this may be of great importance for distinguishing Crohn's disease from similar afflictions. The possibility of secondary infection by an unknown agent that cross-reacts antigenically with *S. cerevisiae* and causes the high titer of antibodies cannot be excluded (Main et al., 1988).

4.4 Distillery yeast

Ethanol production is based mainly on the use of the genus *Saccharomyces cerevisiae* that is well adapted to various distillery mashes, especially molasses and starch substrates. It exerts tolerance to ethanol and temperature (up to 30 °C), high fermentation rate (24–48 hours), high yield relating to the consumed substrate unit and a low amount of by-products. Distilling yeast should not agglutinate and sediment. It is not able to transform starch, pentoses and lactose (Tvrdouň and Bálašová, 1986).

Today, ethanol is often produced using multispecies microbial consortia containing yeast, bacteria and molds (*Candida* sp., *Kluyveromyces*, *Monilia*, *Fusarium*, *Clostridium*), or a cellulose or lignocellulose complex is hydrolyzed and the released saccharides (hexoses

losy (Rao et al., 2008). Lignocelulózové zbytky (D-glukosa, D-xylosa) využívá i kvasinka *Pachysolen tannophilus* (Sánchez et al., 2002).

4.5 Geneticky modifikované kvasinky

Nejvhodnějším modelem pro genové manipulace u eukaryot jsou kvasinky. Mají stabilní haploidní i diploidní stav, rostou rychle, je zde možnost klonování a snadná izolace mutantů. Geneticky modifikované kvasinky jsou obvykle nepatogenní. Rekombinantní proteiny mohou být získány s malými náklady v relativně velkém množství. Neobsahují toxiny či virové inkluze, tím jsou bezpečné i pro konzumaci i člověkem. Pozměněné či umělé kombinace genů mění či doplňují genovou výbavu kvasinek, a to především metabolické dráhy, které se týkají tvorby sloučenin (vitamíny, aminokyseliny, antibiotika, enzymy). Dochází tedy k produkci bílkovin v nepříbuzných organismech (Hee-Kyoung et al., 2009; Rosypal et al., 2002).

Pro modifikace se využívá mutagenese DNA, rekombinantních technik, regulace genové funkce, mimojaderné dědičnosti atd. U *Saccharomyces cerevisiae* byl objeven tzv. 2 µm plasmid, který se stal základem pro konstrukci řady episomálních plasmidových vektorů. Dalšími druhy vektorů jsou integrační či replikační plasmidy, „umělé“ chromosomy atd. (Brown, 2007).

Organismy, u nichž jsou v největší míře prováděny genové manipulace, jsou *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* a v posledních letech výrazně i *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha* či *Kluyveromyces lactis*. Praktické využití nových vlastností kvasinek a jejich produktů v průmyslu, zemědělství a zdravotnictví je základem pro moderní biotechnologie (Rosypal et al., 2002).

Jako organismu pro intracelulární i extracelulární expresi heterologních proteinů se velmi často využívá methylotrofní kvasinka *Pichia pastoris*. Výhodou proteinů produkovaných *P. pastoris* je jejich správné sbalení a správná formace disulfidických vazeb, glykosylace a vylučování. *P. pastoris* je málo náročná na kultivační prostředí, jako zdroj energie a uhlíku jí slouží methanol. Díky jednoduchému složení média se vyloučené bílkoviny snáze čistí a izolují, což *P. pastoris* zvyšuje oproti jiným kvasinkám či jiným mikroorganismům. V literatuře se udává, že *P. pastoris* je schopna produkovat více než 400 prokaryotních, eukaryotních i virových bílkovin (Chiruvolu et al., 1997; Potvin et al., 2012).

4.6 Kvasinky jako modelový systém

Vhodným modelovým organismem pro studium exprese DNA i bílkovin, genových manipulací, posttranslačních modifikací genového produktu atd. u eukaryot jsou právě kvasinky. Kvasinky jsou snadno kultivovatelné a díky vysoké koncentraci metabolitů a hustotě buněk je u nich možné zjistit i malá množství metabolitů. Umožňují změřit i stresové odpovědi buňky spojené s metabolismem.

Schizosaccharomyces pombe je jeden ze šesti eukaryotních organismů, jehož genom byl kompletně osekvenován; fyzická mapa genomu v roce 1993 (Hoheisel et al., 1993; Mizukami et al., 1993), osekvenování genomu v roce 2001 (Wood et al., 2002). Tento jednobuněčný organismus má 3 chromosomy s 4 824 geny, což je méně než u některých prokaryot. V průměru má jeden gen 2 528 bp. Díky své „jednoduchosti“ je vhodným modelem pro řadu fyziologických, metabolických pochodů i pro studium stavby buňky. Typickým znakem chromosomů *S. pombe* jsou velké centromery. Nemá ale zcela jasné, proč kvasinky, které se rozmnožují příčným dělením, mají centromery asi 300–1000x větší než stejné kvasinky, které se rozmnožují pučením (Wood et al., 2002).

Díky sekvenování genomu je možné zjistit, které geny jsou jedinečné pro buňky eukaryot. Vysoce konzervované geny mezi osekvenovanými eukaryoty jsou např. geny pro cytoskeleton, kontrolu buněčného cyklu, proteolysu, atd. Celkem se určilo 62 vysocí konzervovaných genů u eukaryot, které nejsou přítomny u prokaryot. Tyto geny jsou nezbytné pro „stálou“ eukaryotickou strukturu buňky (Yanagida, 2002).

Jako modelový systém pro zobrazení metabolismu cizorodých látek byla vybrána kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, u níž může probíhat enzymatická degradace látek jak anaerobně, tak aerobně. Biosimulační model může značně napomáhat schválení léčiv díky zjištění fyziologických účinků metabolitů léčiva a poskytuje podrobnější pohled na metabolismus léčiv v buňce (Clark a Hufford, 1991; Pieper et al., 2009; Srisilam a Veeresham, 2003).

Kvasinka *Yarrowia lipolytica* (dříve *Saccharomycopsis lipolytica*) je široce využívaná v průmyslových aplikacích (produkce citrónové kyseliny, VCP). Exkrety řadu proteinů (zásadité nebo kyselé proteasy, RNázy, lipasy) do média v množství, které je využitelné pro průmyslové aplikace. *Y. lipolytica* je vhodná také pro studium metabolických

and pentoses) are then transformed anaerobically by the suitable microorganism. The disadvantage of this method is the formation of by-products that depreciate the quality of ethanol. Fermentation mostly takes longer (Flores et al., 2000; Rao et al., 2008).

Non-traditional yeasts used for the ethanol production (or having good characteristics) belong to the genera *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Rhodotorula*, *Zygosaccharomyces*, *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia* and *Cryptococcus*, fermenting xylose with ethanol yield of 0.12–0.38 g/g xylose (Rao et al., 2008). Lignocellulose residues (D-glucose, D-xylose) are transformed by the yeast *Pachysolen tannophilus* (Sánchez et al., 2002).

4.5 Genetically modified yeast

Yeast is the most reliable model for the genetic manipulations in eukaryotes since it possesses stable haploid and diploid state, fast growth, and can be used for cloning and easy mutant isolation. Genetically modified yeast is normally not pathogenic. Recombinant proteins are obtained at a low cost in a relatively high quantity. They are free of toxins or viral inclusions and thus safe for consumption even by humans. Altered or artificial gene combinations change or complement the genetic apparatus of yeast, especially metabolic pathways related to the production of vitamins, amino acids, antibiotics and enzymes. Thus the proteins are produced in unrelated organisms (Hee-Kyoung et al., 2009; Rosypal et al., 2002).

Several techniques are used for genetic modifications – DNA mutagenesis, recombinant techniques, regulations of gene functions, extranuclear inheritance, etc. In *Saccharomyces cerevisiae*, a 2 µm plasmid is essential for the preparation of a series of episomal plasmid vectors. Other vectors include integrative or replicative plasmids, artificial chromosomes, etc. (Brown, 2007).

Organisms that undergo most frequently genetic manipulation include *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and lately also *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*. Practical use of new properties of yeast and their products in industry, agriculture and medicine is the basis for modern biotechnologies (Rosypal et al., 2002).

The methylotrophic yeast *P. pastoris* is widely used for the intracellular and extracellular expression of heterologous proteins. The advantage of protein production in *P. pastoris* is the correct folding and formation of disulfide bonds, glycosylation and extrusion. *P. pastoris* is a modest microorganism, using methanol as a source of energy and carbon. Owing to the simple composition of media the proteins extruded by *P. pastoris* are easy to purify and isolate compared to other microorganisms. Production of more than 400 prokaryotic, eukaryotic and viral proteins using *P. pastoris* has been described (Chiruvolu et al., 1997; Potvin et al., 2012).

4.6 Yeast as a model system

Yeast is a reliable model organism for the study of DNA and protein expression, gene manipulations, post-translation modifications, etc. Yeast is easy to cultivate and an ultra-low concentration of metabolites can also be detected with regards to the obtainable concentration of cells and their metabolites. Yeast can be used for measurements of stress responses connected with metabolism.

The genome of *Schizosaccharomyces pombe* is one of the six eukaryotic genomes that was completely sequenced; physical map was produced in 1993 (Hoheisel et al., 1993; Mizukami et al., 1993), genome sequencing in 2001 (Wood et al., 2002). The genome of *S. pombe* comprises 3 chromosomes with 4 824 genes and is thus smaller than in some prokaryotes. The average size of one gene is 2 528 bp. Because of this „simplicity“ *S. pombe* is a reliable model for the study of physiological and metabolic processes and also for the cell architecture studies. *S. pombe* has long centromeres. It is not clear why the centromeres of *S. pombe* (reproducing by binary fission) are 300–1,000 times larger than those of *S. cerevisiae* that reproduces by budding (Wood et al., 2002).

The genes unique for eukaryotes can be found by means of sequencing. Highly conserved genes (within the eukaryotes sequenced to date) include, e.g. genes encoding cytoskeleton, genes responsible for cell cycle control, proteolysis, etc. A total of 62 highly conserved genes unique for eukaryotes (and not present in prokaryotes) are essential for eukaryotic organization to be established (Yanagida, 2002).

S. cerevisiae is used as a model system for the research of the metabolism of xenobiotics since the yeast is able to degrade heterogeneous substances by means of anaerobic as well as aerobic pathways. The bio-simulation model allows for determining the physiological effects of drug metabolites and may thus be helpful in drug

drah (Beckerich et al., 1998; Gonzales-Lopez et al., 2002; Nelson a Young, 1987).

4.7 Patogenní kvasinky

Mezi kvasinkami se vyskytuje málo patogenních rodů, nejčastější jsou rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia* a *Trichosporon*. Většinou jde o potenciální patogeny, které vyvolávají onemocnění zejména u oslabeného organismu (Thewes et al., 2008). V posledních letech přibývají klinické nálezy i dalších kvasinek (*Geotrichum*, *Rhodotula*, *Saccharomyces*, *Hansenula*) u pacientů se sníženou imunitou (např. léčba antibiotiky, kortikoidy, prodělaný chirurgický zákrok, závažné onemocnění – AIDS, leukémie). Není ovšem zcela jasné, zda tyto kvasinky přímo souvisí s onemocněním (Bonini et al., 2008; Mestroni a Bava, 2003).

Candida albicans běžně kolonizuje slizniční povrchy. Pro oslabený organismus se může stát patogenem a může způsobit chronické povrchové infekce, v horším případě i multiorgánové smrtelné infekce. Patogenita závisí na změně exprese, funkce a aktivitě běžných genů (Meiler et al., 2009; Thewes et al., 2008). *Candida glabrata* je další klinicky běžně izolovanou kvasinkou. Mechanismus virulence *C. glabrata* není zcela přesně znám, ale přisuzuje se změnám v karyotypu, kdy organismus buď ztratí, nebo získá chromosom (Poláková et al., 2009).

Cryptococcus neoformans je opouzdřená kvasinka, která může být příležitostně vnitrobuněčný patogen a může způsobovat nemoci u pacientů se sníženou imunitou, zejména u lidí s AIDS, pacientů s transplantací nebo zhoubnými nádory (Wozniak a Levitz, 2008). *Malassezia* spp. je součástí běžné kožní mikroflóry lidí i zvířat, u oslabeného organismu může způsobovat kožní i systémové onemocnění (Tai-An a Hill, 2005). *Trichosporon* spp. je oportunně patogenní kvasinka, která je běžným etiologickým agens rozšířených kvasinkovitých infekcí a bílých plísňovitých onemocnění vlasů (Chagas-Neto et al., 2008). Klinický výskyt *Trichosporon asahii* se týká především vážných systémových a nosokomiálních infekcí předčasně narozených dětí nebo novorozenců (Téllez-Castillo, et al., 2008).

Saccharomyces cerevisiae je rovněž oportunní patogen. V současné době vzrůstá počet klinických isolátů od jedinců se sníženou imunitou. Ve studii Wheeler et al. (2003) byla porovnávána virulence kmene izolovaného z klinického materiálu, kmene izolovaného z ovoce a běžného laboratorního kmene na myším modelu. Kmeny z klinického a rostlinného materiálu byly pro myš letální, laboratorní kmen se ukázal jako avirulentní. Virulentní kmeny neobsahovaly gen *ssd1* a rostly za vyšší teploty. Potlačení funkce genu *ssd1*, které vede ke změnám složení a stavby buněčné stěny, je pravděpodobně příčinou růstu virulence klinického i rostlinného kmene *S. cerevisiae* (Wheeler et al., 2003).

5 ZÁVĚR

Pro využití kvasinek v potravinářském průmyslu je asi nejdůležitějším organismem *Saccharomyces cerevisiae*, díky které lidé již po tisíciletí slastně okoušejí chuť piva, vína, lihovin a kynutého pečiva. Nutno ale dodat, že tato chuť se neustále mění, což je dáno jednak přirozeným vývojem a mutacemi, ale i působením (zásahem) lidí a jejich činnostmi, a to jak při genetických modifikacích kvasinek, tak při ovlivňování životních podmínek, kterým se kvasinky snaží neustále přizpůsobit.

Některé kvasinky jsou oportunně patogenní. Virulenci značně napomáhá tvorba slizovitého pouzdra nebo tvorba biofilmu. Nejčastěji propuká kvasinkovitě onemocnění u lidí s oslabenou imunitou (po léčbě antibiotiky, po operaci, při vážné chorobě atd.).

Neméně důležité jsou kvasinky jako modelový organismus. Rychle se dělí, jejich celý genom je osekvcován, jsou snadno kultivovatelné, „mnohé“ již o nich víme a navíc genetickými zásahy můžeme snadno ovlivnit jejich chování. Proto jsou vhodné jako modely různých metabolických, fyziologických drah či genetiky eukaryot. Další velkou výhodou je, že žádní aktivisté nebudou bojovat za práva kvasinek, když se na nich bude např. zkoušet účinek zdraví škodlivé látky, jako tomu je u zvířecích modelů.

Poděkování

Tato práce byla podpořena z finančních prostředků Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM0021622413) a Ministerstva zemědělství ČR (RO1012).

approval process (Clark and Hufford, 1991; Pieper et al., 2009; Srisilam and Veeresham, 2003).

The yeast *Yarrowia lipolytica* (formerly *Saccharomycopsis lipolytica*) is widely used in industrial applications (citric acid production, production of single cell protein). It excretes a range of proteins (alkaline or acid proteases, RNases, lipases) into the media in a quantity convenient for industrial use. *Yarrowia lipolytica* is also suitable for metabolic pathway research (Beckerich et al., 1998; Gonzales-Lopez et al., 2002; Nelson and Young, 1987).

4.7 Pathogenic yeasts

Only a few yeast genera are pathogenic, namely *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia* and *Trichosporon*. In most cases they are opportunistic pathogens causing diseases to an immunocompromised organism (Thewes et al., 2008). However, other yeast genera (*Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Hansenula*) have recently been found in clinical material from patients with reduced immunity (e.g. under treatment with antibiotics, corticoids, after surgical treatment, or suffering from serious disease – AIDS, leukemia). It is not clear if the presence of yeast directly relates to the disease (Bonini et al., 2008; Mestroni and Bava, 2003).

Candida albicans is a common commensal of the human microflora but it can also cause a variety of infections ranging from superficial mucosal infections to hematologically disseminated afflictions. Its virulence depends on the differences in the expression, function or activity of common genes (Meiler et al., 2009; Thewes et al., 2008). *Candida glabrata* is also commonly isolated from clinical material. The mechanisms of its virulence have not been fully elucidated but it is believed to be caused by changes of yeast karyotype – loss or acquisition of a chromosome (Poláková et al., 2009).

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast, opportunistic intracellular pathogen that may cause diseases to patients with reduced immunity, especially those suffering from AIDS, patients with transplantations or malignant tumors (Wozniak and Levitz, 2008). *Malassezia* spp., as a component of common skin microflora of people and animals, may cause skin and systemic disease to immunocompromised patients (Tai-An and Hill, 2005). Opportunistic pathogenic yeast *Trichosporon* spp. is a common etiological agent of widely distributed yeast infections and white piedra, mycosis of the hair (Chagas-Neto et al., 2008). Clinical incidence of *Trichosporon asahii* relates predominantly to serious systemic and nosocomial infections of prematurely born infants or newborns (Téllez-Castillo et al., 2008).

Saccharomyces cerevisiae is also an opportunistic pathogen. At present it is being increasingly isolated from immunocompromised patients. The virulence of a clinical isolate, a wild-type strain isolated from fruit, and a common laboratory strain was compared in a mouse model. The plant strain was lethal for mice while the laboratory strain was avirulent. Virulent strains did not contain the *ssd1* gene and grew at a higher temperature. Suppression of the *ssd1* gene leading to changes in the composition and cell wall structure of the yeast cell surface causes probably increase in virulence (Wheeler et al., 2003).

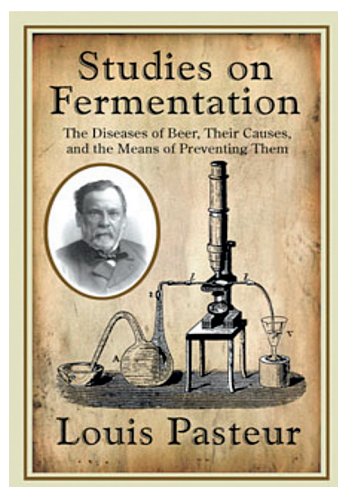
5 CONCLUSION

The most important organism in terms of use in food industry is probably *Saccharomyces cerevisiae*, which has for thousands of years been responsible for the delight people experience when tasting beer, wine, spirits and raised bread and pastry. It should be noted, however, that this taste keeps constantly changing owing to natural selection and mutations, and also owing to the interventions into the activity of yeast caused by humans. These interventions include both genetic modifications of yeast and manipulations with the life conditions, which yeast has to face and adjust to.

Some yeasts are potential pathogens. Virulence is promoted by the capsule or biofilm formation. Immunocompromised people (after a treatment with antibiotics, surgical treatment, serious diseases, etc.) are the most prone to yeast infection.

Use of the yeast as a model organism is of no less importance. It reproduces fast, its genome is known, it is easy to cultivate, much is already known about it and its behavior can furthermore be affected by genetic treatments. Thus it is suitable as a model for the research into eukaryotic metabolism, physiology and genetics. Another great advantage is that yeast, unlike the animal models, does not induce any activists to fight for its rights, and can be safely used for testing, e.g., effects of substances hazardous for human health.

Článek byl zpracován na základě bakalářské práce J. Kopecká: Kvasinky a jejich využití (studijní program Biologie, obor Obecná biologie, směr Mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, 2009).



Literatura / References

- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství – Teorie a praxe výroby piva. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha, 904 s.
- Beckerich, J., Boisramé-Baudevin, A., Gaillardin, C., 1998: *Yarrowia lipolytica*: A model organism for protein secretion studies. *Int. Microbiol.*, 1: 123–130.
- Bendová, O., Kahler, M., 1981: Pivovarské kvasinky. SNTL, Praha. 118 s.
- Berman, J., 2006: Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current Opinion Microbiol.* 9: 595–601.
- Bonini, A., Capatti, C., Parmeggiani, M., Gugliotta, L., Micozzi, A., Gentile, G., Capria, S., Girmenia, C., 2008: Galactomannan detection in *Geotrichum capitatum* invasive infections: Report of 2 new cases and review of diagnostic options. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62: 450–452.
- Boulton, C., Quain, D., 2001: Brewing & fermentation. Wiley-Blackwell, Londýn, 656 s.
- Brown, T. A., 2007: Klonování genů a analýza DNA: Úvod. (překlad Fellner M.). Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc 389 s.
- Clark, A. M., Hufford, C. D., 1991: Use of microorganism for the study of drug metabolism: An update. *Med. Res. Rev.* 11: 473–501.
- Dengis, P. B., Nélissen, L. R., Rouxhet, P. G., 1995: Mechanism of yeast flocculation: Comparison of top- and bottom-fermenting strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 718–728.
- Eisenman, H. C., Casadeval, A., McClelland, E. E., 2007: New insights on the pathogenesis of invasive *Cryptococcus neoformans* infection. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 9: 457–464.
- Farkaš, V., 2003: Structure and biosynthesis of fungal cell walls: Methodological approaches. *Folia Microbiol.* 48: 469–478.
- Flores, C., Rodríguez, C., Petit, T., Gancedo, C., 2000: Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 507–529.
- Gélinas, P., Fiset, G., Willemot, C., Goulet, J., 1991: Lipid content and cryotolerance of bakers' yeast in frozen doughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 463–468.
- Gonzalez-Lopez, C. I., Szabo, R., Blanchin-Roland, S., Gaillardin, C., 2002: Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Genetics* 160: 417–427.
- Hauser, N. C., Fellenberg, K., Gil, R., Bastuck, S., Hoheisel, J. D., Pérez-Ortín, J. E., 2001: Whole genome analysis of a wine yeast strain. *Comp. Funct. Genom.* 2: 69–79.
- Hee-Kyoung, K., Ji-Young, P., Joon-Seob, A., Seung-Heuk, K., Doman, K., 2009: Cloning of a gene encoding dextranase from *Lipomyces starkeyi* and its expression in *Pichia pastoris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 172–177.
- Hoheisel, J. D., Maier, E., Mott, R., McCarthy, L., Grigoriev, A. V., Schalkwyk, L. C., Nizetic, D., Francis, F., Lehrach, H., 1993: High resolution cosmid and P1 maps spanning the 14Mb genome of the fission yeast. *Cell* 73: 109–120.
- Chagas-Neto, T. C., Chaves, G. M., Colombo, A. L., 2008: Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia* 166: 121–132.
- Chiruvolu, V., Cregg, J. M., Meagher, M. M., 1997: Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 277–283.
- Janderová, B., Bendová, O., 1999: Úvod do biologie kvasinek. Karolinum, Praha. 108 s.
- Jin, Yu-Lai, Speers, R. A., 1998: Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* 31: 421–440.
- Kalina, T., Váňa, J., 2005: Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha. 606 s.
- Kamzolova, S. V., Finogenova, T. V., Lunina, O. N., Perevoznikova, O. A., Minachova, L. N., Morgunov, I. G., 2007: Synthesis citric and isocitric acids by *Yarrowia lipolytica* during yeasts growth on rape-seed oils. *Microbiologia* 76: 26–31.
- Klis, F. M., Boorsma, A., de Groot, P.W.J., 2006: Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 185–202.
- Kocková-Kratochvílová, A., 1957: Kvasinky. SVTL, Bratislava. 344 s.
- Kocková-Kratochvílová, A., 1982: Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy. Alfa, Bratislava. 409 s.
- Kocková-Kratochvílová, A., 1990: Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. Alfa, Bratislava. 704 s.
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., Palková, Z., 2003: Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol. Microbiol.* 47: 745–754.
- Main, J., McKenzie, H., Yeaman, G. R., Kerr, M. A., Robson, D., Pennington, Ch.R., Parrat, D., 1988: Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 297: 1105–1106.
- Masy, C. L., Henquinet, A., Mestdagh, M. M., 1992: Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*: Inhibition by sugars. *Can. J. Microbiol.* 38: 1298–1306.
- Matoulková, D., Šavel, J., 2007: Brewing and the taxonomy of brewer's yeast. *Kvasny Prum.* 53(7–8): 206–214.
- Meiler, T. F., Hube, B., Schild, L., Shirliff, M. E., Scheper, M. A., Winkler, R., Ton, A., Jabra-Rizk, M. A., 2009: A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*. Proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS ONE*. 4: e5039.
- Mestroni, S. C., Bava, A.J., 2003: Fungemia by *Hansenula anomala*. *Rev. Argent. Microbiol.* 35: 54–56.
- Miki, B. L. A., Hung Poon, N., James, A.P., Seligy, V.L., 1982: Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 150: 878–889.
- Mizukami, T., Chang, W. I., Gargavits, I., Kaplan, N., Lombardi, D., Matsumoto, T., Niwa, O., Kounousu, A., Yanagida, M., Marr, T.G., Beach, D., 1993: A 13 kb resolution cosmid map of the 14Mb fission yeast genome by nonrandom sequence-tagged site mapping. *Cell* 73: 121–132.
- Nelson, G., Young, T. W., 1987: Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1461–1469.
- Němec, M., Horáková, D., 2002: Základy mikrobiologie pro učitelé studium. Vydavatelství MU, Brno. 233 s.
- Nisiotou, A. A., Spiropoulos, A. E., Nychas, G. E., 2007: Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6705–6713.
- Palková, Z., 2004: Multicellular microorganisms: Laboratory versus nature. *EMBO Rep.* 5: 470–476.
- Pennisi, E., 2005: Wine yeast's surprising diversity. *Science* 309: 375–376.
- Pieper, I., Wechler, K., Katzberg, M., Brusch, L., Sorensen, P.G., Mensonides, F., Bertau, M., 2009: Biosimulation of drug metabolism – A yeast based model. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36: 157–170.
- Poláková, S., Blume, Ch., Zárate, J.Á., Mentel, M., Jørck-Ramberg, D., Stenderup, J., Piškur, J., 2009: Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106: 2688–2693.
- Potvin, G., Ahmad, A., Zhang, Z., 2012: Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem. Eng. J.* 64: 91–105.
- Pronk, J. T., Steensma, H. Y., Dijkem van, J. P., 1996: Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12: 1607–1633.
- Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y., Mikata, K., Nakao, Y., Ashikari, T., 2006: Pure and mixed lines of *Saccharomyces bayanus* and

- Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3968–3974.
- Rao, R. S., Bhadra, B., Shivaji, S., 2008: Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. *Lett. Appl. Microbiol.* **47**: 19–24.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003: Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **86**: 169–180.
- Rose, A. H., Harrison, J. S., 1991: *The Yeast – Yeast organelles*. Academic Press, London: 9–16.
- Rosypal, S., Doškař, J., Petržík, K., Růžicková, V., 2002: Úvod do molekulární biologie, 4.díl. Brno: 1141–1152.
- Sánchez, S., Bravo, V., Castro, E., Moya, A.J., Camacho, F., 2002: The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**: 641–648.
- Schlemm, D. J., Crowe, M. J., McNeill, R. B., Stanley, A. E., Keller, S. J., 1999: Medicinal yeast extracts. *Cell Stress Chaperones* **4**: 171–176.
- Smidt de, O., Preez du, J. C., Albertyn, J., 2008: The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: A comprehensive review. *FEMS Yeast Res.* **8**: 967–978.
- Speers, R. A., Durance, T. D., Tung, M. A., Tou, J., 1993: Colloidal properties of flocculent and nonflocculent brewing yeast suspensions. *Biotechnol. Prog.* **9**: 267–272.
- Srisilam, K., Veeresham, C., 2003: Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. *Biotechnol. Adv.* **21**: 3–39.
- Stratford, M., 1992: Yeast flocculation: Reconciliation of physiological and genetic viewpoints. *Yeast* **8**: 25–38.
- Stratford, M., Assinder, S., 1991: Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast* **7**: 559–574.
- Sugawara, T., Takahashi, S., Osumi, M., Ohno, N., 2004: Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **339**: 2255–2265.
- Swiegers, J. H., Kievit, R. L., Siebert, T., Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., King, E. S., Pretorius, I.S., 2009: The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food. Microbiol.* **26**: 204–211.
- Šašek, V., Becker, G. E., 1969: Effect of different nitrogen sources on the cellular form of *Trigonopsis variabilis*. *J. Bacteriol.* **99**: 891–892.
- Silhánková, L., 2002: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologu*. Academia, Praha. 363 s.
- Tai-An, Chen, Hill, P. B., 2005: The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.* **16**: 4–26.
- Téllez-Castillo, C.J., Gil-Fortuño, M., Centelles-Sales, I., Sabater-Vidal, S., Serrano, F. P., 2008: *Trichosporon asahii* fatal infection in a preterm newborn. *Rev. Chil. Infect.* **25**: 213–215.
- Thewes, S., Moran, G. P., Magee, B. B., Schaller, M., Sullivan, D. J., Hube, B., 2008: Phenotypic screening, transcriptional profiling, and comparative genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of *Candida albicans*. *BMC Microbiol.* **8**: 187.
- Tosch, W., Geiger, E., Stretz, D., Robson, G. D., Drucker, D. B., 2005: Polar lipids of brewer's yeasts. *J. Inst. Brew.* **111**: 197–202.
- Tvrdoň, M., Báležová, B., 1986: *Kvasná mikrobiologie*. SNTL, Praha, 168 s.
- Van Hamersveld, E. H., van der Lans, R.G.J.M., Luyben, K.Ch.A.M., 1997: Quantification of brewer's yeast flocculation in a stirred tank: effect of physical parameters on flocculation. *Biotechnol. Bioeng.* **56**: 190–200.
- Vázquez-Tsuji, O., Campos-Rivera, T., Ahumada-Mendoza, H., Rondán-Zárate, A., Martínez-Barbabosa, I., 2005: Renal ultrasonography and detection of pseudomycelium in urine as means of diagnosis of renal fungus balls in neonates. *Mycopathologia* **159**: 331–337.
- Veelders, M., Brückner, S., Ott, D., Unverzagt, C., Mösch, H., Essen, L., 2010: Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 22511–22516.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F. R., 2003: Yeast flocculation: What brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 197–205.
- Vodrážka, Z., 2006: *Biochemie*. Akademie věd ČR, Praha. 191 s.
- Wheeler, R. T., Kupiec, M., Magnelli, P., Abeijon, C., Fink G. R., 2003: A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with increased virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 2766–2770.
- Wood, V. and 130 co-authors, 2002: The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, **415**: 871–880.
- Wozniak, K. L., Levitz, S. M., 2008: *Cryptococcus neoformans* enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. *Infect. Immun.* **76**: 4764–4771.
- Yanagida, M., 2002: The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol.* **3**: comment 2003.1–2003.4.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 14. 8. 2012

Přijato k publikování / Accepted for publication: 1. 10. 2012



MIKROBIOLOGICKÉ ŠKOLENÍ PRACOVNÍKŮ PROVOZNÍCH PIVOVARSKÝCH LABORATOŘÍ

Mikrobiologické oddělení VÚPS, a.s., pořádá podle potřeby mikrobiologická školení
pro pracovníky provozních pivovarských laboratoří.

Akci lze realizovat v zasedací místnosti VÚPS v Praze nebo v Brně, nebo po dohodě ve vhodných prostorech objednatele.

Školení je realizováno na 3 úrovních, dle požadavků zákazníka je lze kombinovat nebo rozšiřovat.

Bližší informace na www.beerresearch.cz.

Kontaktní osoba: RNDr. Dagmar Matoulková, matoulkova@beerresearch.cz, tel.: + 420 224 900 132.