

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

RASTOVÉ LÁTKY – SÚČASŤ VÝŽIVY KVASINIEK
Bakalárska práca

Študijný program:	Agrobiotechnológia
Študijný odbor:	5.2.25 Biotechnológia
Školiace pracovisko:	Katedra biochémie a biotechnológie
Školiteľ:	Ing. Eva Szabová, PhD.

Nitra 2010

Tibor Szakal

Čestné vyhlásenie

Podpísaný Tibor Szakal vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Rastové látky – súčasť výživy kvasiniek“ vypracoval samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomý zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 15. marca 2010

Tibor Szakal

Pod'akovanie

Dovoľujem si touto cestou poďakovať vedúcej bakalárskej práce Ing. Eve Szabovej, PhD. za pomoc, odborné rady, usmernenie a podnetné pripomienky, ktoré mi poskytla pri vypracovaní tejto práce.

Zároveň chcem poďakovať svojej rodine za podporu a trpezlivosť počas môjho štúdia.

V Nitre 11.mája 2010

Abstrakt

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* patria medzi askomycéty. Najčastejšie sa rozmnožujú nepohlavne, pučaním. Zloženie živného média a fyzikálno-chemické podmienky používané pri kultivácií týchto mikrobiálnych buniek odzrkadľujú ich fyziologický fenotyp a kvasné schopnosti.

Pri kultivácií sa používajú prirodzené a synteticko-komplexné živné pôdy. Kvasinky *S.cerevisiae* vyžadujú pre svoj rast kyslé prostredie, už slabo alkalické prostredie ich rast inhibuje. Sú však schopné upravovať pH roztoku produkciou amoniaku.

Z hľadiska výživy ich možno zaradiť medzi chemoheterotrofné organizmy. Najprístupnejší im je uhlík vo forme sacharidov. Ako zdroj dusíka možno použiť organické látky alebo anorganické amónne soli. Ich zdrojom v živných pôdach sú prírodné látky, ako napríklad peptón, kvasničný autolyzát, sladina a podobne. Živná pôda musí obsahovať biogénna a tiež stopové prvky. Do živného média sa pridávajú aj vitamíny skupiny B.

Kvasinky *S.cerevisiae* nachádzajú široké uplatnenie v potravinárskom priemysle, či už pri výrovné piva, vína, etanolu, chleba, alebo ako nosiče nutrične hodnotných látok. Využívajú sa tiež ako krmivo vo forme krmneho droždia.

Kľúčové slová: *Saccharomyces*, kultivácia, biomasa, rastové látky

Abstract

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* are among the Ascomycotina. Mostly they breed asexually, by germination. Nutrient medium composition and physico-chemical conditions used for cultivation of these microbial cells, reflect the physiological phenotype and fermentation capacity. Natural and synthetic mediums are used for cultivation. Yeast *S. cerevisiae* require for its growth acidic environment, slightly alkaline environment inhibits their growth. However, they are able to adjust the pH of a solution with ammonia production. In terms of nutrition they can be classified as chemoheterotrophic organisms. Most accessible to them is carbon in the form of carbohydrates. As a source of nitrogen, organic substances or inorganic ammonium salts can be used. Their sources in mediums are natural substances such as peptone, yeast autolysates, wort, etc. Culture medium must include biogenic and trace elements. Into nutrient media is added the B group vitamins. Yeast *S. cerevisiae* have wide application in food industry, whether in the production of beer, wine, alcohol, bread, or as carriers of nutritionally valuable substances. Is also used as feed in the form of feed yeast.

Keywords: *Saccharomyces*, cultivation, biomass, growth substances

Obsah

Zoznam skratiek a značiek.....	8
Úvod.....	9
1 Cieľ práce.....	10
2 Metodika práce.....	11
3 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky.....	12
3.1 Kvasinky.....	12
3.1.1 Morfológia kvasiniek.....	13
3.1.2 Cytológia kvasiniek.....	13
3.1.3 Štruktúrne komponenty.....	14
3.1.3.1 Bunková stena.....	15
3.1.3.2 Biomembrány.....	16
3.1.3.3 Bunkové komponenty.....	17
3.2 Rozmnožovanie kvasiniek.....	18
3.2.1 Nepohlavné (vegetatívne) rozmnožovanie.....	18
3.2.2 Pohlavné (generatívne) rozmnožovanie.....	19
3.3 Charakterizácia rodu Saccharomyces.....	20
3.3.1 Taxonomické zaradenie rodu Saccharomyces.....	21
3.4 Kultivácia kvasiniek rodu Saccharomyces.....	22
3.5 Kultivačné princípy a riadenie kultivácií.....	23
3.5.1 Vsádzkové kultivácie.....	23
3.5.2 Kontinuálne procesy.....	24
3.5.3 Kultivácie s prítokovaním.....	24
3.5.4 Kombinované postupy.....	25
3.5.5 Riadenie kultivácií.....	26
3.6 Živé pôdy používané pri kultivácii kvasiniek.....	27
3.7 Výživa kvasiniek.....	28
3.7.1 Voda.....	28

3.7.2 Uhlík.....	29
3.7.3 Dusík.....	30
3.7.4 Biogénne prvky.....	31
3.8 Rastové látky.....	33
3.8.1 Vitamíny ako rastové látky.....	33
3.8.2 Aminokyseliny ako rastové látky.....	36
Záver.....	38
Použitá literatúra.....	39

Zoznam skratiek a značiek

YP	kvasnicový peptónový extrakt
DM	minerálne médium
YNB	kvasničné dusíkaté bázy
SC (YNB+Suppl)	rovnocenne doplnená synteticko-kompletné médium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
BS	bunková stena
ER	endoplazmatické retikulum
GA	golgiho aparát
μ	micro, 10^{-6}
D	zriedovacia rýchlosť

Úvod

Kvasinky sú mikroskopické huby, voľným okom neviditeľné, ktoré sa nachádzajú všade v prírode. Keďže netvorí samostatnú taxonomickú skupinu, nie je možné ich definovať.

Najstaršie nálezy, ktoré poukazujú na prítomnosť kvasiniek, pochádzajú z územia dnešného Iránu z obdobia približne 8500-4000 rokov p.n.l. To dokazuje, že kvasenie, teda kvasinky, boli známe už v starom Babylone, kde sa zo skvaseného odvaru z vyklíčeného obilia pripravoval nápoj, ktorý sa považuje za predchodcu piva.

Tieto mikroorganizmy sú najjednoduchšie eukaryotické heterotrofné organizmy, ktoré ako prvý pozoroval Antoni van Leeuwenhoek, a popísal ich ako malé guľôčky v pive. V histórii ľudskej populácie majú kvasinky významné miesto z ekonomického, sociálneho i zdravotného hľadiska. Sú tiež často popisované ako najstaršie „domestikované organizmy“, ktoré sú po tisícročia využívané pri výrobe alkoholických nápojov a kysnutého pečiva.

Dnes sú kvasinky veľmi dôležitými priemyslovými mikroorganizmami. Pomocou nich sa totiž riadi celý rad biochemických technológií, ako výroba droždia, pečiva, vína, piva, ušľachtilých destilátov. Sú tiež využívané v oblasti vedy a medicíny. Treba spomenúť, že kvasinky sú ideálnymi modelovými organizmami pre štúdium všeobecných regulácií metabolizmu eukaryotických buniek, ďalšie pôsobia ako faktory vyvolávajúce ochorenia. Okrem tradičných výrobných postupov sú tiež využívané v rade ďalších aplikácií. Geneticky modifikované kvasinky sú producentmi farmakologických preparátov používaných v prevencii i liečbe ochorení.

Kvasinky nachádzajúce sa voľne v prírode sú nevyšľachtené, hovoríme, že sú „divé“. Tie kvasinky, ktoré sa využívajú v biochemických technológiách, či už v rámci vedy, potravinárskeho alebo farmaceutického priemyslu, sú špeciálne vyšľachtené kmene, ktoré vznikli dlhoročným šľachtením a sú označované podľa chemických a fyziologických vlastností. Avšak vedci dodnes skúmajú aké sú najvhodnejšie spôsoby kultivácie, hodnoty jednotlivých fyzikálnych faktorov (teplota, pH, atď.), množstvá životne dôležitých látok (sacharidy, biogénne a stopové prvky), ktoré by zaručovali vyšľachtenie dokonalého kvasinkového kmeňa. Dôkazom o snahu vytvoriť čo najoptimálnejšie podmienky pre kultiváciu kvasiniek je množstvo vedeckých pokusov uskutočňovaných v tejto oblasti.

1 Cieľ práce

Cieľom bakalárskej práce bol(a):

- Biochemická charakteristika kvasiniek rodu *Saccharomyces*
- prehľad kultivačných metód využívaných v biochemických technológiách za účelom tvorby biomasy;
- prehľad rastových faktorov pre optimálnu produkciu biomasy;

2 Metodika práce

Vzhľadom k stanovenému cieľu, ktorým bolo teoreticky poukázať na kultivačné metódy a priaznivé účinky rastových látok, bola bakalárska práca vypracovaná z dostupných informácií z odborných a vedeckých časopisov, popisujúcich stav riešenej problematiky a z rôznych prístupných databáz na internetových stránkach. Pri spracovaní literárnych poznatkov sme pozornosť venovali týmto kľúčovým témam: charakteristika kvasiniek rodu *Saccharomyces*, kultivácia, výživa kvasiniek a rastové faktory.

Získané a preštudované literárne zdroje sme použili ako podklad pre napísanie bakalárskej záverečnej práce.

3. Štúdia o súčasnom stave riešenej problematiky

3.1 Kvasinky

Kvasinky z botanického hľadiska zaraďujeme medzi huby - vzhľadom na ich veľkosť medzi mikroskopické huby. Za predchodcov húb sa najčastejšie považujú fotosyntetické riasy, ktoré stratili schopnosť tvoriť chlorofyl, a tým aj schopnosť fotosyntézy (napr. *Protothecá*). Napriek tomu, že spôsobom života sa *Protothecá* veľmi podobajú deliacim sa kvasinkám, považujú iní za predchodcov húb červenej riasy (Kocková -Kratochvílová, 1982).

Sú to heterotrofné eukaryotické mikroorganizmy. Netvoria jednotnú taxonomickú skupinu. Mikroorganizmy patriace medzi kvasinky sú väčšinou jednobunkové organizmy, ktoré sa rozmnožujú prevažne pučaním. Ako zdroj energie využívajú kvasenie, a ako zdroj uhlíka organické substráty (www.sci.muni.cz).

V prírode sú tieto mikroorganizmy veľmi rozšírené. Nachádzajú sa hlavne tam, kde sa vyskytujú cukrové roztoky: na ovocí, v ovocných šťavách. Prenášajú sa vzduchom alebo vodou z miesta na miesto, a keď sa dostanú do cukrových roztokov spôsobujú samovoľné kvasenie. Táto ich schopnosť bola zo začiatku využívaná vo veľkom meradle. Víno, medovina, pivo a iné kvasené nápoje sa vyrábali iba samovoľným kvasením. Dnes sa samovoľné kvasenie uplatňuje už iba vo vinárstve pri výrobe kvasených muštov a ušľachtilých destilátov. Tu spolu s ovocím prichádza do tekutiny dostatočné množstvo kvasiniek s požadovanými vlastnosťami, ktoré keď sa rozmnožia usmerňujú kvasenie.

Podobne ako u chleba, kde dobrý zákvas má priaznivý vplyv na priebeh kysnutia, využíva sa tiež u piva, že kvasenie závisí od kvality zákvasu. Sledovaním vhodných vlastností sa postupne vyšľachtili druhy, ktoré zaručovali rovnakú a lepšiu kvalitu výrobku a podstatne rýchlejšie kvasenie.

Dlhodobou kultiváciou za rovnakých podmienok a neustálym výberom dobre kvasiacich typov vznikli kvasinky určitých ustálených vlastností, ktoré sa fyziologicky líšili od kvasiniek v prírode. Dnes nazývame kvasinky zámerne získavané v rôznych kvasných priemysloch kvasinkami kultúrnymi, a ostatné kvasinky zase divokými (www.pangamin.cz).

3.1.1 Morfológia kvasiniek

Bunky kvasiniek voľným okom nevidno, a preto ich je možné pozorovať iba mikroskopom. Bunky kvasiniek majú rôzny tvar. Pod vplyvom vonkajších podmienok nastáva zmena tvaru bunky, ktorá tiež súvisí s vlastnou funkciou bunky. Základný tvar buniek kvasiniek je rotačný elipsoid a odchýlky v tvaroch sú dvojakého druhu: zmena na podlhovasté až vláknité tvary a zmena na guľaté tvary. Bunka kvasiniek aj počas štádií vývoja môže meniť svoj tvar. Bunka prenesená do nového živného prostredia si najprv musí zvyknúť na nové podmienky a musí načerpať látky, aby si mohla urobiť zásobu energie pre rozmnožovanie. Prebiehajú v nej viacstupňové biochemické procesy, bunka zväčšuje svoje rozmery, a to najskôr dĺžku. Na konci tohto štádia vývoja býva najpredĺženejšia. Keď nastane intenzívne rozmnožovanie, dcérske bunky sa oddeľujú od materskej bunky ešte skôr ako sa stihli dorásť do pôvodnej veľkosti. Pritom sa väčšinou zaokrúhľujú a zmenšujú. Keď rozmnožovanie pomaly ustáva, bunky začínajú rásť do väčších rozmerov. Pomaly dozrievajú, tvarom a veľkosťou sa vyrovnávajú pôvodným bunkám. Veľkosť buniek závisí aj od stupňa ploidity: najmenšie bývajú haploidy a so stúpajúcou ploiditou sa bunky zväčšujú a zaokrúhľujú (Kocková-Kratochvílová, 1982).

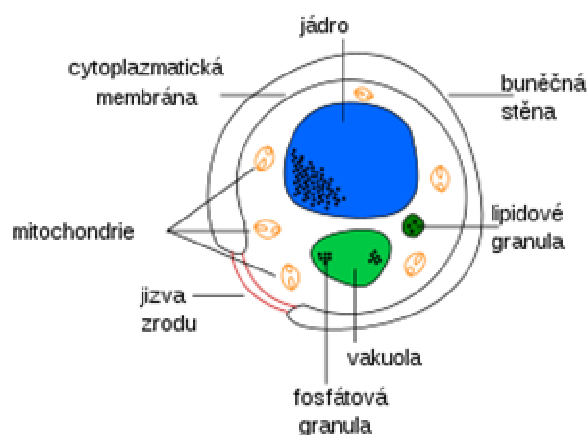
3.1.2 Cytológia kvasiniek

Najvrchnejšia organela kvasinkovej bunky je bunková stena, udáva jej tvar a tvorí obal, ktorý chráni bunku pred nepriaznivými vplyvmi okolitého prostredia. Z celkovej hmotnosti bunky zaberá približne 25%. Táto masívna povrchová štruktúra poskytuje osmotickú a fyzikálnu ochranu bunky. Hrá tiež úlohu pri sexuálnom rozpoznaní medzi bunkami opačného párovacieho typu, flokulácii, sporulácii a odpovedi na stres. Je esenciálna pre rozmnožovanie buniek, bunky zbavené bunkovej steny už nie sú schopné konjugácie, ani cytokinézy. BS je komplexom makromolekúl, ktoré obalujú bunku z vonkajšej strany až k plazmatickej membráne, teda zahŕňa i periplazmatický priestor.

BS kvasiniek pozostáva hlavne z β -1,3-glukánu, β -1,6-glukánu, chitínu a glykozylovaných proteínov. Hrúbka vnútornej, elektrónovo transparentnej vrstvy je

približne 70-100 nm. Jej hrúbka závisí predovšetkým od rastových podmienok a genetického vybavenia bunky. Mechanickú odolnosť steny zabezpečuje vnútorná vrstva. Pozostáva hlavne z β -1-3-glukánovej siete a chitínu. Táto vrstva tvorí približne 50-75% hmotnosti suchej steny. Vonkajšia vrstva obsahuje viacnásobne glykozylované manoproteíny, ktoré vyčnievajú z povrchu bunky. Vonkajšia vrstva obmedzuje priepustnosť cudzích enzýmov, akými sú napr. obranné enzýmy v rastlinných tkanivách, schopné degradovať BS. Sacharidové bočné reťazce povrchových proteínov obsahujú viacnásobné fosfodiesterové mostíky, ktoré s voľnými karboxylovými skupinami proteínov prispievajú k početným negatívnym nábojom na bunkovom povrchu pri fyziologickej hodnote pH. Tieto bočné manánové reťazce sú zodpovedné za hydrofilné vlastnosti steny a mohli by sa zúčastňovať pri zadržiavaní vody a ochrane pred vysychaním. Vonkajšia proteínová vrstva zaberá približne 1/3 zo suchej hmotnosti bunkovej steny. Proteíny bunkovej steny sú kovalentne viazané k β -1,3-glukán-chitínovej sieti, buď priamo alebo nepriamo, cez β -1,6-glukán-glykozylfosfatidylinozitolovú kotvu. Navyše proteíny bunkovej steny môžu byť navzájom kovalentne viazané disulfidovými mostíkmi. Okrem toho niektoré proteíny sú zadržiavané v bunkovej stene iónovými a neiónovými interakciami (Mazáň, Mazáňová, Farkaš, 2006).

3.1.3 Štruktúrne komponenty

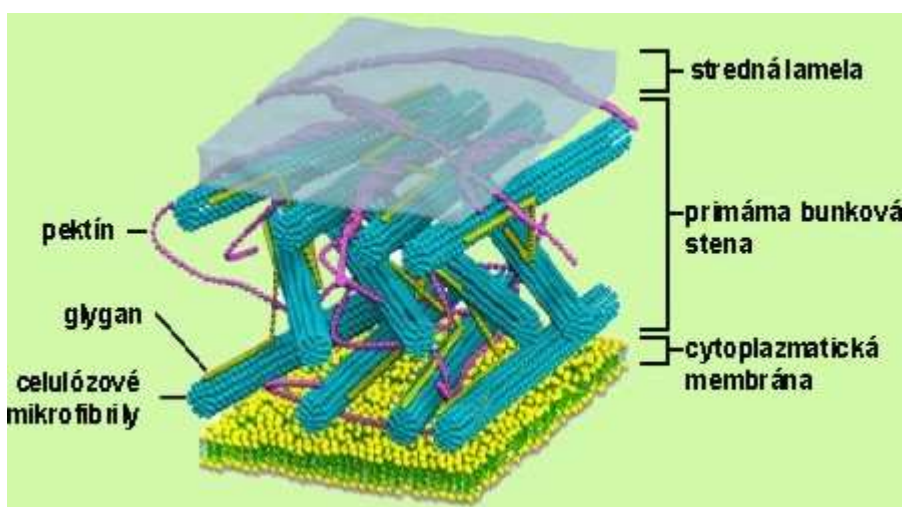


Zdroj: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky>

3.1.3.1 Bunková stena

Nie všetky druhy patriace do ríše húb vytvárajú bunkovú stenu. Tá je tvorená celulózou a chitínom, pôsobí ako ochranný faktor, vonkajšia kostra a ochrana pred osmotickou lýzou. Zloženie a štruktúra bunkovej steny húb závisí viac, ako u iných organizmov, na prostredí, životnom cykle a úlohe bunky (sk.wikipedia.org a).

Polysacharidy bunkovej steny môžu byť jednozložkové (homopolysacharidy) alebo viaczložkové (heteropolysacharidy) - napr. arabomanány, galaktomanány, xylomanány. Polysacharidy určujú predovšetkým imunologické vlastnosti kvasiniek, pretože pôsobia ako antigény. Ide predovšetkým o manoproteíny, ktorých antigénny charakter je určený dĺžkou bočných reťazcov manozylových zvyškov, spojených α -1,2- a α -1,3 väzbami. Polysacharidovo-proteínové komponenty bunkovej steny sa taktiež podieľajú na flokulačných schopnostiach kvasiniek (Mazáň, Mazáňová, Farkaš, 2006).



Zdroj: <http://biologia.sengym-moodle.sk/index.html#stena.html>

Podľa Kidbyho a Daviesa (1970) má bunková stena tri vrstvy:

- **Vonkajšia vrstva** je orientovaná smerom do prostredia. Obsahuje manoproteíny spojené disulfidovými mostíkmi. Vonkajšia vrstva obmedzuje priepustnosť cudzích enzýmov.
- **Stredná vrstva** je tvorená β -1,6-glukánom, glukánproteínmi a manoproteínmi.
- **Vnútorňá vrstva** prilieha na cytoplazmatickú membránu a je zložená z mikrokryštalického β -1,3-glukánu. Zabezpečuje mechanickú odolnosť steny. Reprezentuje asi 50 - 60% sušiny bunkovej steny.

3.1.3.2 Biomembrány

Biomembrány tvoria povrchové štruktúry organel i systém vnútorných membrán. Sú zložené z lipidov a proteínov. V bunke plnia rozličné funkcie, ktoré sa zakladajú hlavne na vytváraní bariér pri látkovej premene. Bez nich by mohlo dôjsť počas milisekundy k vyrovnaniu všetkých koncentrácií, a tým k zastaveniu metabolizmu. Systém membrán vo vnútri bunky rozdeľuje jej vnútro na viaceré časti, ktoré sa správajú ako oddelené reakčné priestory a kinetické oddiely.

Štruktúra cytoplazmatickej membrány je najlepšie popísaná v rámci mozaikového modelu bunkových membrán, ktorý hovorí, že molekuly fosfolipidov sú usporiadané v dvoch vrstvách tak, že polárne časti sú na vonkajších stranách a nepolárna vo vnútri membrány (cs.wikipedia.org).

V membráne kvasiniek sú vo veľkej miere zastúpené látky: kefalín, lecitín a fosfatidy. Z mastných kyselín sú zastúpené prevažne kyselina steárová, a olejová a palmitová. Okolo nepolárnej a polárnej časti sú uložené globulárne bielkoviny. Taktiež sa tu nachádzajú lipidy (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Cytoplazmatická membrána tvorí elastický obal protoplastu, osmotickú bariéru a kontroluje transport látok (cs.wikipedia.org).

Obklopuje cytoplazmu a má dôležitú úlohu pri syntéze zložiek bunkovej steny, vylučovaní extracelulárnych enzýmov, viaže vápenaté a horečnaté ióny a obsahuje ATP-ázu. V závislosti od druhu a fyziologického stavu kvasiniek možno na membráne

pozorovať charakteristické invaginácie do cytoplazmy. Obsahuje približne 50% proteínov, 40% lipidov, 7% RNA, 1% DNA a 6% sterolov (Bendová, Kahler, 1981).

3.1.3.3 Bunkové komponenty

Cytoplazma je vodný roztok, v ktorom sa nachádzajú všetky membránové štruktúry. Nachádzajú sa tu aj zrnká bielkovinového a lipidového charakteru, napr. peroxizómy.

Endoplazmatické retikulum má podobné zloženie ako v bunkách rastlín a živočíchov. Na rezoch bunkou vidno, že vytvára cisterny, lamely alebo tubuly. Skladá sa z dvoch membrán, ktoré uzatvárajú vrstvu vodnatej kvapaliny. Môžu sa v nej nachádzať aj jednotlivé globulárne telieska. ER sa spravidla spája s jadrovou membránou. Nachádza sa väčšinou tesne pod cytoplazmatickou membránou. Vnútorňý povrch membrány je hladký a v porovnaní s vonkajším zrnitým povrchom je labilnejší k autolýze a fixácii. ER je miestom syntézy peptidov a bielkovín (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Ribozómy sú globulárne štruktúry v priemere 20-30 nm veľké. Rozpad ribozómov môžu zapríčiniť ióny Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} . Ribozómy kvasiniek sú voľné alebo viazané na membrány endoplazmatického retikula. Hlavnou funkciou ribozómov je syntéza bielkovín.

Golgiho aparát je organela, ktorá sa nachádza len v eukaryotických bunkách. V normálne rastúcich bunkách kvasiniek existuje vo forme diktyozómov, sploštených cisterien, s uvoľňujúcimi sa mechúrikmi na oboch protiľahlých póloch cisterien. V kvasinkách funkciu GA čiastočne preberá endoplazmatické retikulum.

Vakuoly majú priemer rozličný, od 0,3 do 3 μm . Spravidla býva v bunke jedna veľká vakuola, najčastejšie guľatá a niekoľko malých. Ohraničené sú membránou nazývanou tonoplast (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Bunkové jadro je guľatá až laločnatá organela nachádzajúca sa v strede bunky alebo uložená excentricky. Jadro v bunkách kvasiniek je pomerne malé. Je ohraničené jadrovou membránou - karyolémou, ktorá vyzerá ako dvojité membrána zložená z dvoch jednotkových membrán, medzi ktorými je perinukleový priestor s polotekutým obsahom. Vnútorňá membrána je trochu hrubšia ako vonkajšia (asi 50 nm). Celá karyoléma má póry. Okraje týchto pórov vyčnievajú na oboch stranách ako prstence.

Mitochondrie sú tvorené dvoma systémami membrán, vonkajšími a vnútornými. Vnútorná membrána vytvára do vnútra mitochondrií záhyby a tie sa nazývajú kristy. Medzi membránami vznikajú dva priestory: medzi vonkajšou a vnútornou membránou vzniká medzimembránový priestor a medzi kristami medzikristový priestor. Priestor ohraničený vnútornou membránou vyplňa matrix. Mitochondrie sú organely špecializované na respiráciu a oxidačnú fosforyláciu s vlastným genetickým systémom a proteosyntézou (Kocková-Kratochvílová, 1982).

3.2 Rozmnožovanie kvasiniek

Pri kvasinkách rozoznávame pohlavné a nepohlavné, t.j. generatívne a vegetatívne rozmnožovanie.

3.2.1 Nepohlavné (vegetatívne) rozmnožovanie

Nepohlavne - sa kvasinky rozmnožujú pučaním. Na povrchu materskej bunky sa v okolí jedného bodu štruktúra bunkovej steny pozmení a na tomto mieste sa objaví púčik. Púčik postupne rastie, až veľkosťou dosiahne rozmery materskej bunky. Medzitým sa jadro mitoticky rozdelí na dve a jedno z nich prejde do dcérskej bunky. Uzavretím septa a dotvorením bunkovej steny sa obe bunky navzájom oddelia (www.iam.fmph.uniba.sk).

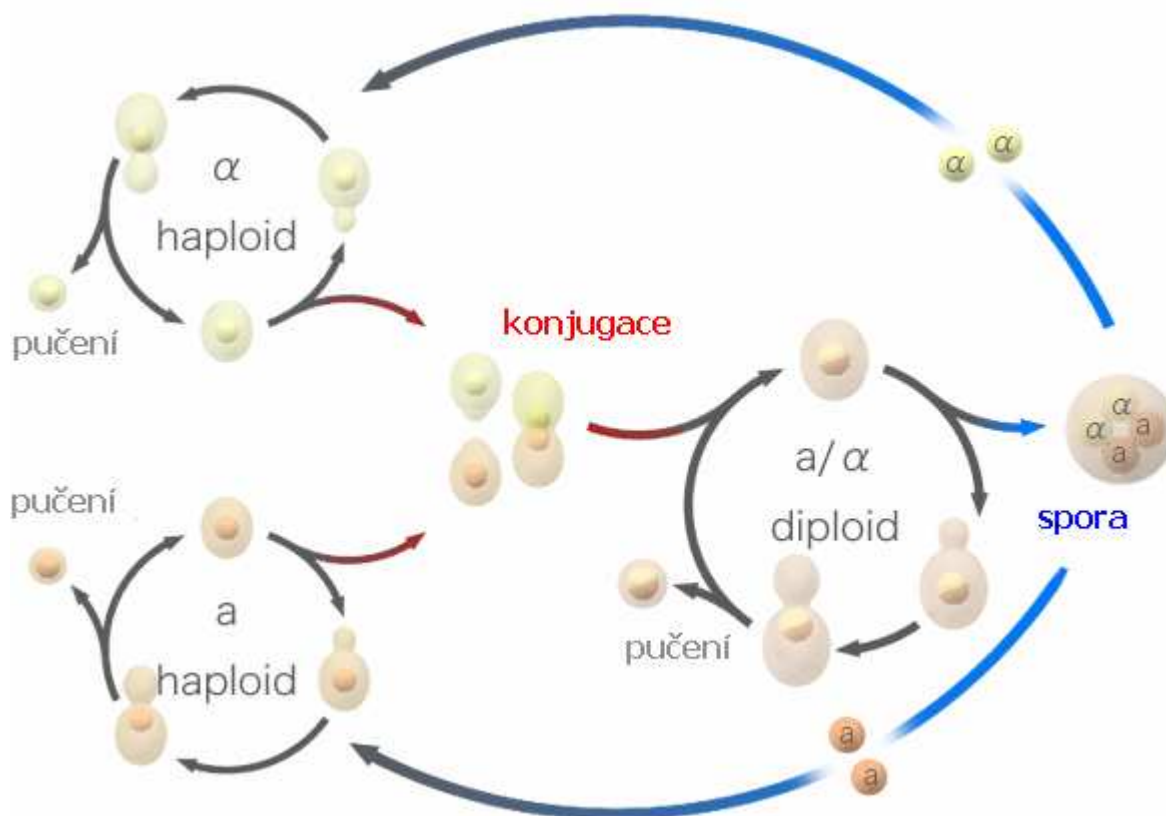
Na materskej bunke v mieste oddelenia dcérskej bunky zostáva jazva. Podľa počtu jaziev možno určiť vek bunky, zodpovedajúci počtu dcérskych buniek, ktoré sa na nej vytvorili. Pri pučiach rodov, medzi ktoré patria aj *Saccharomyces*, sa preto ich povrch mení. Povrch vekovo mladších buniek je hladký a sférický, pri starších bunkách dochádza v dôsledku pučania k deformáciám. Niektoré kvasinky sa rozmnožujú delením (Špický, Šubík, 1992).

Podľa miesta, kde púčik na povrchu kvasinky vzniká, možno rozlíšiť pučanie monopolárne, bipolárne a multipolárne, prípadne môžu púčiky vznikať aj celkom náhodne (Kocková-Kratochvílová, 1982).

3.2.2 Pohlavné (generatívne, sexuálne) rozmnožovanie

Pohlavne – popri vegetatívnom rozmnožovaní je známy aj pohlavný spôsob rozmnožovania, ktorý vo všeobecnosti charakterizuje splývanie dvoch haploidných buniek, dvoch fyziologicky odlišných párovacích typov „a“ a „α“ a ich jadier za vzniku diploidnej bunky – zygoty. Zygota má typický piškótovitý tvar. Zygóty môžu vegetatívnym mitotickým delením jadier vytvoriť diploidné potomstvo, ktorého bunky môžu meiózou (v prírode za nepriaznivých podmienok) vytvoriť haploidné spóry. Spóry môžu mitózou vytvoriť vegetatívne haploidné potomstvo. Väčšina kvasiniek tvorí, ako výsledok pohlavného rozmnožovania, *askospóry*, čo sú endospóry umiestnené v asku. Askus môže mať romboidný, lineárny alebo pyramidálny tvar. Tvar askov závisí od pôvodného tvaru materskej bunky, ktorý je u kvasinkových kmeňov variabilný aj v rámci toho istého kmeňa. V základných parametroch sú však veľkosť a tvar bunky druhovo, ba i kmeňovo špecifické.

V súvislosti so sexuálnym správaním kvasiniek sa najčastejšie stretávame s termínmi *heterotalizmus* a *homotalizmus*. Termínom *homotalizmus* označujeme schopnosť samooplodnenia. Bunky toho istého kmeňa môžu kopulovať aj medzi sebou. Medzi haploidnými kmeňmi heterotalických druhov rozoznávame dve alebo viac skupín z hľadiska ich párovacieho správania sa. Kmene nekonjugujúce medzi sebou tvoria skupinu, ktorú nazývame párovým alebo párovacím typom. Tieto párovacie typy sa nelíšia morfológicky, ale iba fyziologicky (www.iam.fmph.uniba.sk).



Zdroj: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Zivotnickyklusvasinky.PNG>

3.3 Charakteristika rodu *Saccharomyces*

K najlepšie prebádaným a technologicky najdôležitejším mikroorganizmom patria kultúrne kvasinky rodu *Saccharomyces*. Tento rod predstavuje nepochybne ekonomicky najvýznamnejšiu skupinu mikroorganizmov používaných v priemysle. Množstvo kvasiniek produkovaných každoročne pivovarskými a liehovárenskými technologickými postupmi tvorí rádovo milióny ton. Druhy z tohto rodu sú schopné skvasovať väčšinu cukrov. Nikdy však nevyužívajú laktózu ako zdroj uhlíka, ani NO_3^- ako zdroj dusíka (www.sci.muni.cz).

3.3.1 Taxonomické zaradenie rodu *Saccharomyces*

- nadríša: *Eukaryota*,
- ríša: *Fungi*,
- oddelenie: *Ascomycota*,
- trieda: *Saccharomycetes*,
- čeľad': *Saccharomycetaceae*,
- rod: *Saccharomyces* (Števlíková, 2006).

Podľa Rosypala (2003) spoločným znakom najväčšieho oddelenia húb *Ascomycota* je tvorba sporangia, označovaného ako vrečko (askus). Vrečko u kvasiniek predstavuje jedinú diploidnú bunku v životnom cykle. Vo vrecku dochádza k meióze a vzniku haploidných askospór.

Rod *Saccharomyces* patrí medzi technologicky najdôležitejšie rody. Druhy patriace do tohto rodu sú schopné skvasovať väčšinou druhov sacharidov. Nikdy nevyužívajú laktózu ako zdroj uhlíka a NO_3^- ako zdroj dusíka. Nepohlavne sa rozmnožujú multipolárnym pučaním, pohlavne askospórami. Najdôležitejším druhom je *Saccharomyces cerevisiae*, ktorý sa uplatňuje ako liehovarnícka, pekárska a vrchná pivovarská kvasinka. Skvasuje glukózu, sacharózu, maltózu, galaktózu a skvasuje úplne rafinózu. Pri kmeňoch používaných na výrobu pekárskeho droždia a piva sa vyžaduje vyrovnanosť tvaru (bunky vajcovité alebo krátke elipsoidné) a veľkosti buniek a stálosť ich technologických vlastností.

Pivovarské kvasinky – tzv. vrchné pivovarské kvasinky, z rafinózy odštepujú len fruktózu, ktorú skvasujú a v prostredí zostáva nerozložený disacharid. Názov dostali od toho, že po ukončení kvasenia (pri 20 - 25 °C) sú ich bunky vynášané na povrch fermentačnej tekutiny. Naproti tomu tzv. spodné pivovarské kvasinky sú schopné rafinózu väčšinou rozložiť úplne a po prekvasení (6 - 10 °C) klesajú na dno kvasnej nádoby – spodné kvasinky sú zaradované do druhu *S. uvarum*. Avšak vznik vitálneho a stabilného potomstva po krížení s vrchnými, pekárskymi a droždiarskymi kvasinkami ukázal, že ide o zástupcov jediného druhu, a preto mnohí autori zaradujú tieto kvasinky do druhu *S. cerevisiae* (Tančinová, et al, 2008).

3.4 Kultivácia kvasiniek rodu *Saccharomyces*

Podmienky kultivácie kvasiniek

Pri kultivácii kvasiniek je nutné dodržať pre optimálny rast a rozmnožovanie, presne určené hodnoty fyzikálnych faktorov a rastových látok.

pH prostredia

Kvasinky vyžadujú pre svoj rast kyslé prostredie, optimálne pH teda sa pohybuje medzi 4,2-5,5. Už v slabo alkalickom tlmivom prostredí (pH 7,5) sa zastavuje ich rast. V netlmivom prostredí si však kvasinky veľmi skoro upravujú pH smerom k optimálnej hodnote.

Pre druh *Saccharomyces cerevisiae* je minimálna hodnota pH pre rast 3,0-3,8. Optimum pH sa pohybuje v rozpätí 4,2 - 5,0. Pri pH 7,3 - 7,5 sa rast zastaví (Šilhánková, 2002).

Pri sledovaní vývoja kvasinkových kolónií v čase bolo zistené, že kolónie periodicky menia pH svojho okolia z acidického na alkalické a naopak. Pre acidickú fázu je typický rast kolónií, zatiaľ čo v alkalickej fáze je rast prechodne inhibovaný. Prepnutie z acidickej fázy do alkalickej je spojené s produkciou amoniaku, ktorý funguje ako signál medzi susednými kolóniami a ktorý ovplyvňuje periodicitu prepínania (Strachotová, et al, 2005).

Teplota

Teplota kultivácie je jeden z najdôležitejších faktorov kultivácie. Pri vyššej teplote, v začiatkoch kultivácie, dochádza k rýchlejšiemu narastaniu biomasy, spojenému s rýchlejšou produkciou etanolu, avšak v neskorších štádiách fermentácie je rast biomasy inhibovaný naakumulovaným množstvom etanolu. Pri nižších teplotách je vyššia koncentrácia etanolu dosahovaná až po značne predĺženom čase fermentácie (Rebroš, 2005).

Kvasinky sa kultivujú spravidla pri 25 až 28 °C, čo je optimálna teplota na rozmnožovanie väčšiny kvasiniek. Niektoré kvasinky rastú lepšie pri 37 °C, iné zasa pri 20 °C. Najnižšia teplota, pri ktorej kvasinky rastú, je 4 až 5 °C, najvyššia 40 °C. Optimálna teplota na rozmnožovanie nemusí byť rovnaká s optimálnou teplotou na produkciu niektorého metabolitu.

Citlivosť na teplotu závisí aj od stupňa ploidity, diploidné bunky *S. cerevisiae* sú 2,5-krát menej citlivé na tepelný šok ako haploidné bunky. Pivovarnícke kvasinky kvasia aj pri 0 °C, ale rozmnožovanie pri tejto teplote neprebíha. Kvasinky kultivované pri nízkych teplotách výrazne zvýšia kvasenie, keď sa kultivačná teplota naraz zvýši (Šepel'ová, et al, 2003).

3.5 Kultivačné princípy a riadenie kultivácií

3.5.1 Vsádzkové kultivácie

Podľa Šturdíka a Zigovej (1999) u kvasiniek sa tento typ kultivácií používa iba zriedkavo. Dôvodom je ich citlivosť na vysokú koncentráciu glukózy. V prípade, že treba nakultivovať biomasu, je potrebné, aby kultúra rástla v aeróbných podmienkach a bola limitovaná glukózou. Aj v prípade, že ide o produkciu etanolu, nie je jedno, pri akej koncentrácii sacharidu bude tento produkovaný. Z týchto dôvodov sa vsádzkové kultivácie používajú iba na výskumné účely. Pomocou nich možno parciálne zistiť, aké podmienky by sa mali použiť pri prítokovaných a kontinuálnych fermentáciách. Na základe fermentačnej kinetiky vo vsádzke možno predpovedať a riadiť prítokovaný proces pri stanovenej optimálnej koncentrácii glukózy a pri stanovených iných kultivačných podmienkach. Možno tiež zisťovať aktivitu vyprodukovaného enzýmu. Vsádzkové kultivácie sú tiež pomôckou pri stanovovaní optimálneho pH, teploty alebo tlaku kyslíka pre vybraný proces. Vsádzkový proces sa pri *S. cerevisiae* v priemysle síce nevyužíva, ale je veľmi dobrou pomôckou pri ďalšom vývoji kultivačných aparátúr a pri výbere riadiacich metód procesov.

3.5.2 Kontinuálne procesy

Kontinuálne vedené kultivácie sú u *S. cerevisiae* oveľa frekventovanejšie využívané ako vsádzkové. Takýto proces sa osvedčil najmä pri použití kvasiniek, ktoré nie sú geneticky manipulované. Častá je kontinuálna produkcia etanolu alebo metabolitov, ktoré sú prirodzenými produktmi metabolizmu bunky, ako aj kontinuálna produkcia kvasničnej biomasy pre potravinárske účely. Zistilo sa, že so zmenou koncentrácie kyslíka v aerácii, okysličovaním vzduchu, sa počas kultivácie výrazne mení metabolizmus i rast kvasiniek. S jej zvyšovaním sa zvyšuje aj rýchlosť spotreby kyslíka, narastá biomasa a poklesne koncentrácia glycerolu. Ak sa toto deje v prostredí nadbytku glukózy je zaujímavé, že výťažnosť etanolu sa pritom nezmení. Pri vyššej koncentrácii kyslíka ako 40% sa glycerol celkom stratí, pričom sa objavia iné metabolity a koncentrácia etanolu klesá. Výrazne sa mení aj zloženie mastných kyselín v prospech nenasatovaných kyselín. Zmena zriedovacej rýchlosti (D) a teploty počas procesu tiež výrazne ovplyvňuje priebeh kultivácie. S nárastom D poklesne obsah trehalózy a zásobného glykogénu v bunkách, pričom ale obsah proteínov a RNA značne narastie. Tento pozitívny vplyv sa však stratí pri zvýšení teploty na 38 °C a koncentrácia trehalózy značne narastie. Dobré výsledky produkcie biomasy možno dosiahnuť v procese kontinuálnej kvasinkovej kultivácie so zriedovacou rýchlosťou práve zabezpečujúcou výlučne oxidatívny rast, nad ktorou sa však už rast mení na oxidatívno-fermentatívny. Takýto rast je pri produkcii biomasy nežiadúci, lebo znižuje jej výťažnosť. Produkcia biomasy alebo etanolu nerekombinovanými bunkami je v kontinuálnej kultivácii alebo fermentácii výhodná (Šturdík, Zigová 1999).

3.5.3 Kultivácie s prítokovaním

Kultivácie s prítokovaním sú v biotechnologickom priemysle všeobecne najčastejšie používané. Majú viacero výhod. Pomocou prítokovania možno do média pridávať vyčerpané živiny, resp. tieto sa na začiatku nemusia dodať vo vysokých a často inhibičných koncentráciách, ako to býva u vsádzkových procesov. Ide o zdroje uhlíka, dusíka, fosforu, ale aj vitamínov a aminokyselín. Pri týchto procesoch je aj riziko kontaminácie nižšie, keďže ide o procesy kratšie, ako sú kontinuálne. Okrem toho možno proces sledovať a prerušiť práve v optimálnom čase. Dôležitým aspektom pri

týchto procesoch je zloženie média. Všeobecne najlepšie je komplexné médium s kvasničným extraktom, ktoré podporuje rast biomasy aj v neskorých štádiách procesu. Ďalší výrazný vplyv na priebeh procesu má glukóza, resp. zried'ovacia rýchlosť (D). Ak treba, aby bola produkovaná iba biomasa bez etanolu, či iných vedľajších produktov, je potrebné, aby sa D nedostala nad hodnotu, kedy sa oxidatívny rast začína kombinovať s oxidatívno-fermentatívnym rastom. Vtedy možno biomasu *S. cerevisiae* vyprodukovať až do vysokých koncentrácií, nad 50 - 60 g.dm⁻³. Nie menej významným sledovaným parametrom je rastová rýchlosť. Táto je trochu kritickou veličinou, najmä vo veľkých prevádzkach. Je to preto, že koncentrácia glukózy, či inej prítokovanej živiny nie je vo veľkom objeme rovnaká. Nie je totiž možné zabezpečiť, aby sa živiny, okamžite po dávkovaní dostali do všetkých priestorov reaktora. Metabolicko-fyziologická reakcia *S. cerevisiae* na takýto neideálny stav sa už tiež sledovala. Ak sa na inokuláciu použije synchronná kultúra, tak sa v podstate ihneď po začatí prítokovania desynchronizuje.

Taktiež sa sledoval jav, že v miestach, kde sa glukóza dostala skôr, akoby sa lokálne produkoval etanol a rastová rýchlosť bola nižšia, pričom v miestach, kde táto koncentrácia bola optimálna a bunky rástli iba oxidatívne, rastová rýchlosť bola vyššia (Šturdík, Zigová 1999).

3.5.4 Kombinované postupy

Okrem vyššie spomenutých, sa vyvíjali aj rôzne iné spôsoby, ako možno dosiahnuť žiadanú kvasinkovú biomasu, či niektorý z jej produktov. Kontinuálna kultivácia sa veľmi často spája s recykláciou buniek. Vo fermentore možno dosiahnuť týmto spôsobom vysokú koncentráciu biomasy. V kontinuálnom procese, s použitím mikrofiltrácie, možno dosiahnuť koncentráciu biomasy až 300 g.dm⁻³. Súčasne sa môže separovať aj produkt, ak je sekretovaný do média. U proteínov, produkovaných kvasinkami sa tým výrazne zníži nebezpečenstvo proteolýzy, ktorá by nastala, ak by tieto ostali dlhší čas v médiu s biomasou. Kombináciou recyklácie buniek s kultivačným procesom, možno dosiahnuť dlhší čas zadržania kvasiniek vo fermentore, ktorý je potrebný na zvýšenie ich koncovej koncentrácie, najmä v prípade produkcie indukovaných enzýmov (Šturdík, Zigová, 1999).

Ďalšou významnou kombináciou je imobilizácia a kultivačný proces. Imobilizáciou sa výrazne ovplyvní nielen priebeh procesu, ale aj bunky ako také. Bol

sledovaný vplyv na bunkové membrány, zmeny vo fyziológii buniek ako aj v ich metabolizme. Všetko toto súvisí so zmenenými podmienkami procesu vďaka imobilizácii buniek - majú sťažený prístup k živinám a aj prestup kyslíka v takejto kultúre nie je optimálny (Šturdík, Zigová, 1999).

Trendom, ktorý sa rozvíja hlavne v posledných rokoch pri kvasinkových aeróbných procesoch, je cielečné zvýšenie prestupu kyslíka v bioreaktore. Tento efekt možno dosiahnuť pridaním tzv. kyslíkového vektora do rastového prostredia alebo špeciálnou technickou úpravou bioreaktora. Pridanie dodekánu alebo perfluórokarbónu môže napomôcť zvýšeniu produkcie biomasy. Zintenzívnenie prestupu kyslíka technickou úpravou bioreaktora je však v biotechnologickom procese podstatne častejšie. Používajú sa tzv. *air-lift* reaktory s rôznou vnútornou úpravou, zabezpečujúcou lepšie rozptýlenie vzduchových bublín a tým zvýšenie koeficientu prestupu kyslíka. Technickým riešením je namiesto jednoduchého perforovaného venca na dne fermentora, cez ktorý sa privádza vzduch, použiť valec, cez póry ktorého vstupuje vzduch do reaktora prakticky v celom objeme. Je však aj viac iných riešení. Zaujímavý spôsob zlepšenia prestupu kyslíka a tým celého kultivačného procesu je, že sa periodicky strieda prísun vzduchu raz ku stenám *air-liftu* a raz do jeho stredu (Šturdík, Zigová, 1999).

3.5.5 Riadenie kultivácií

Podľa Šturdíka a Zigovej (1999) Najjednoduchšie prítokovanie je v podstate konštantné prítokovanie, teda bez regulácie. Inou jednoduchou možnosťou je zvyšovanie prítoku glukózy podľa jedného externe meraného parametra, ktorým môže byť, napr. koncentrácia biomasy. Najpružnejšie systémy riadenia sú však také, ktoré na základe *on-line* merania jednej, alebo viacerých veličín, riadia prítokovanie samostatne. Tieto systémy sa ešte ďalej delia na priame, nepriame a modelované.

Priame typy riadenia sú také, ktoré podľa istej *on-line* nameranej veličiny priamo ovplyvňujú regulátor prítoku alebo prítoku média. Takými veličinami, pomocou ktorých možno priamo z merania bez ďalších prepočtov a matematických úprav regulovať prítok do bioreaktora, sú koncentrácia etanolu, ktorá sa nesmie zvýšiť nad istú hladinu a glukózy, ktorá musí byť taká nízka, aby nedošlo k jej fermentatívnejmu spracovaniu. Na ich *on-line* meranie je opísaných niekoľko metód. Jednou z možností

stanovenia etanolu počas procesu je plynová chromatografia. Iným spôsobom stanovenia etanolu v bioreaktore je použitie etanolovej elektródy. Tiež je možné použitie hmotnostnej spektrometrie. Nepriame metódy riadenia kultivácií sú založené na meraní jedného alebo viacerých parametrov procesu. Jednou z najjednoduchších možností je meranie CO_2 a O_2 vo výstupnom plyne a ich matematické spracovanie. Modelové metódy riadenia kultivácii - jedným z najnovších prístupov je modelovanie procesu na základe poznania a predpovedania stavu vo vnútri bunky. Algoritmom, ktorý berie do úvahy odhad stavu vnútrobunkových zásob sacharidov, možno dostatočne skoro reagovať na budúce možné metabolické zmeny, a tým ich ovplyvniť pozitívnym smerom (Šturdík, Zigová, 1999).

3.6 Živné pôdy používané pri kultivácii kvasiniek

Kvasinky, ako všetky živé organizmy, potrebujú pre svoj život správnu výživu. Prostredie, ktoré im poskytuje túto výživu, sa nazýva živné médium, živná pôda, živné prostredie. Živná pôda musí spĺňať určité predpoklady:

1. musí obsahovať dostatok vody (vlhkosti), najlepšie ak je izotonická s bunkami kvasiniek (t.j. asi 30% vlhkosti),
2. musí mať základné zložky (uhlík, dusík, fosfor, horčík a iné) pre heterotrofné organizmy
3. musí obsahovať stopové prvky (mikroelementy), ktoré pôsobia v malých dávkach,
4. musí mať rastové faktory, ako sú vitamíny, aminokyseliny a iné,
5. musí mať určité pH, t.j. 6 alebo nižšie.

Živné pôdy môžeme rozdeliť z rôznych hľadísk. Z hľadiska pôvodu ich možno rozdeliť na prirodzené, synteticko-komplexné a syntetické. V praxi sa menej často používajú syntetické médiá. Je to hlavne z dôvodu ich cenovej nedostupnosti (Montville, et al. 2005)

Hahn-Hägerdal a kol. (2005) zistili, že zloženie živného média, používaného na kultiváciu mikroorganizmov, odzrkadľuje ich fyziologický fenotyp a ich kvasné schopnosti, ktoré striedavo ovplyvňujú výsledky analýz a priemyselných aplikácií.

3.7 Výživa kvasiniek

Na rast a rozmnožovanie potrebujú kvasinky správnu výživu. Tú prijímajú zo živného prostredia, ktoré musí spĺňať určité predpoklady. Náročnosť na zloženie živného prostredia vyplýva už z elementárneho zloženia biomasy. Základné zložky výživy kvasiniek sú:

- voda,
- zdroje uhlíka a dusíka,
- prvky dôležité na výstavbu živej hmoty (biogénne prvky - kyslík, vodík, uhlík, dusík, fosfor, horčík),
- prvky potrebné v malom množstve (stopové prvky),
- rastové látky (Kocková-Kratochvílová, 1982).

3.7.1 Voda

Prostredie musí byť dostatočne vlhké. Musí mať aspoň 30% vlhkosti pre kvasinkovité formy a 20% vlhkosti pre ich hýfovité formy. Voda v bunke tvorí 85% a je vo voľnej a viazanej forme. Viazaná voda zabezpečuje potrebné napučiacie účinky pre jej funkčné štruktúry, napr. hydratáciou polysacharidov získava bunková stena a plazmaléma potrebnú pružnosť a rozťažnosť, hydratácia bielkovín v protoplazme umožňuje vitálne reakcie a v povrchových vrstvách umožňuje voda selektívnu priepustnosť. Voľná voda tvorí v bunke predovšetkým transportný prostriedok pri látkovej premene, sprostredkuje rozdelenie medziproduktov látkovej premeny a odvádza prebytočné teplo.

Kvasinky sú mezofyly. Ich intenzita rastu sa zníži vtedy, keď je relatívna vlhkosť nižšia ako 97 - 98%. Ich hydratačné minimum je 90 - 95% relatívnej vlhkosti. Bunky kvasiniek prijímajú kyslík len ak je molekulovo rozpustený vo vode. Ten následne využívajú na svoje oxidačné procesy. Množstvo kyslíka, ktoré takto z prostredia ubudne, do tekutiny znovu difunduje z atmosféry.

Na nerušený chod fyziologických procesov musí mať bunka dostatočný obsah vody. Zníženie obsahu vody môže zapríčiniť fyziologickú disfunkciu bunky a bunka sa

dostáva do stavu pokoja, v ktorom môže bez vykonávania akejkoľvek biologickej činnosti určitý čas pretrvať.

Po prenesení do hypertonickeho prostredia môže bunka stratiť až 60 % pôvodného objemu. Tento proces je vratný. Dostatočný prísun vody jej umožní ďalší fyziologický výkon. Naproti tomu, ak sa obsah vody v bunkách ďalej znižuje, môže nastať desolvácia a vyzrážanie plazmatických koloidov. Bunkové štruktúry sa môžu trvalo poškodiť a bunky môžu odumrieť. Na tejto vlastnosti sa zakladá príprava intaktných sušených kvasiniek na kvasenie alebo prípravu enzýmových preparátov. Pripravujú sa však za zníženej teploty, aby sa mohli opäť oživiť (Kocková-Kratochvílová, 1982).

3.7.2 Uhlík

Kvasinky využívajú početné zdroje uhlíka. Z hľadiska kvasného procesu najdôležitejším zdrojom uhlíka sú sacharidy, avšak kvasinky sú schopné využívať aj niektoré aminokyseliny ako kyselinu glutámovú, alanín, asparagín a po adaptácii aj bežné organické kyseliny: kyselinu octovú, citrónovú, fumárovú, jablčnú, mliečnu a pod. (Kováč, 1990).

Avšak najprístupnejší je uhlík vo forme sacharidov, ktoré využívajú oxidačným, ako aj anoxidačným spôsobom. K základným sacharidom patria hexózy, D-glukóza, D-fruktóza a D-manóza, ktoré sa do prostredia kvasiniek pridávajú v koncentráciách 1-0%. Najľahšie využiteľný sacharid pre kvasinky je sacharóza. Základné sacharidy, D-glukóza, D-fruktóza a D-manóza, využívajú všetky kvasinky oxidačne a viaceré z nich aj anoxidačne. Anoxidačne sa zužitkovávajú aj disacharidy, sacharóza a maltóza, len málo druhov kvasí laktózu. (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Za aeróbných podmienok, keď je koncentrácia substrátu v médiu nižšia ako 5 mol.dm^{-3} , bunka odbúrava glukózu menšou rýchlosťou než v anaeróbných podmienkach, čo označujeme ako Pasteurov efekt. Je to následok základných regulačných mechanizmov, ktoré sa týkajú rôznych kľúčových enzýmov metabolizmu glukózy. Anaeróbne dehydrogenačné pochody prejdú na aeróbny proces, ktorý je sprevádzaný zvýšenou tvorbou biomasy za súčasného zníženia spotreby substrátu. Súčasne sa zastavuje tvorba produktov kvasenia, lebo substrát je oxidovaný na CO_2 a H_2O . Tento fakt má v biotechnológii veľký význam pri produkcii kvasničnej biomasy.

Pri koncentrácii glukózy vyššej ako 5 mol.dm^{-3} za aeróbných podmienok je respirácia potlačená a nastáva klasický fermentačný proces. Tento fenomén sa označuje ako Crabtree efekt (resp. glukózový efekt, alebo kontra-Pasteur efekt). Predpokladá sa, že glukóza inhibuje syntézu enzýmov dýchacieho reťazca a/alebo ich inaktivuje a inaktivuje aj transport cukru do bunky. Tento efekt spôsobuje problémy v kontinuálnych fermentáciách pri zmene zriedovacej rýchlosti z menšej na väčšiu.

Pri menšej zriedovacej rýchlosti je metabolizmus oxidatívny (kvasinky majú tendenciu skvasovať glukózu na CO_2 a biomasu, bez výťažku etanolu) a pri vyšších je fermentačný (etanolová produkcia je vyššia, ale s nižším výťažkom biomasy). Ako ďalší regulačný mechanizmus sa u *S. cerevisiae* uplatňuje katabolická represia. Glukóza, alebo iniciálny produkt glukózového metabolizmu (resp. signál odvodený od nej), inhibuje syntézu rôznych dýchacích a enzýmov glukoneogenézy. (Šilhánková, 2002).

Pri glukóza-senzitívnych (Crabtree-senzitívnych) kvasinkách, akou je aj *S. cerevisiae*, sa môže vyskytovať aj limitovaná oxidácia, keď bunka rastie na sacharidovom substráte a pyruvát je v nadbytku. V prítomnosti kyslíka by sme preto mohli metabolizmus označiť za respiračne fermentatívny. U *S. cerevisiae* je teda optimalizácia respirácie dôležitá pri produkcii biomasy, zatiaľ čo optimalizácia fermentácie je dôležitá v nápojárskom a liehovarníckom priemysle (Šilhánková, 2002).

3.7.3 Zdroje dusíka

Podľa Kockovej-Kratochvílovej (1982) ako zdroj dusíka využívajú kvasinky najčastejšie organické zlúčeniny, ako základ niektorých prirodzených a polosyntetických živných pôd slúži peptón, kvasničná voda, sladina a pod. Amónne soli (síran, fosforečnan, dusičnan amónny) sú látky, ktoré tiež vedú využívať. Aminokyseliny môžu byť zdrojom dusíka a uhlíka súčasne. Bunky rastú dobre hlavne na živnej pôde s asparagínom, kyselinou asparágovou alebo glutámovou, s glutamínom, arginínom, leucínom, alanínom, valínom. Cystín kvasinky takmer nevyužívajú. Bunky vedú využiť ako zdroj dusíka aj primárne, sekundárne a terciárne amíny.

Dusíkaté komponenty ako amoniak, glutamín a kyselina glutámová sú prednostne využívané. Avšak tieto primárne dusíkaté zdroje nemusia byť v substráte k dispozícii alebo sa tu nachádzajú vo veľmi nízkych koncentráciách. Kvasinky po vyčerpaní týchto

zdrojov získavajú potrebný dusík zo sekundárnych zdrojov - aminokyselín, proteínov, purínov, dusičnanov a amidov (Marzulf, 2001).

3.7.4 Biogénne prvky

Fosfor

Má význam pri zostavovaní živných prostredí. Zúčastňuje sa na stavbe dôležitých látok, ako sú fosfoproteidy, fosfolipidy, nukleoproteidy, nukleové kyseliny, fosforylované polysacharidy. Do bunky prichádza aj ako anorganický viazaný ortofosfát, pyrofosfát, metafosfát a polyfosfát.

Jeho dôležitou úlohou je väzba s organickými látkami. Zvyšuje sa tak aktivita niektorých procesov a súčasne vznikajú látky s väzbami, ktorých štiepením sa uvoľňuje energia, teda látky s makroergickými väzbami. Fosfor môže tvoriť v rozličné väzby s organickými zlúčeninami, teda aj rôzne makroergické väzby s rozdielnou zásobou energie, takže ich rozštiepením sa uvoľní rozličné množstvo energie (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Do živných prostredí sa pridáva fosfor vo forme draselných, amónnych a niekedy aj sodných fosfátov. Najčastejšie sa používa KH_2PO_4 , pretože ustáľuje pôdy na vhodnejšom pH. Ak sa má pH udržať vyššie, alebo ak sa pridávajú iné kyslé tlmivé látky, alebo sa tieto látky tvoria ako metabolity, pridáva sa K_2HPO_4 , prípadne sa tieto dva fosforečnany kombinujú vo vhodnom pomere. Do živných pôd sa pridávajú v kryštalickej forme. Na úpravu prostredia s nízkym obsahom asimilovateľného dusíka sa používajú amónne fosforečnany (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Vápnik

Obsah vápnika v bunkách sa mení. Priemerne tvorí 2,85% popola. Vody bohaté na vápnik, použité v prevádzkach, zvyšujú hladinu vápnika až na 7,58% v popole.

Ióny vápnika v prostredí s neutrálnym pH pôsobia na zvýšenie povrchového napätia. Vápnik sa teda vhodne uplatňuje v prostredí, kde môže podstatne zvýšiť povrchové napätie (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Horčík

Tvorí priemerne 6% popola a 0,4% sušiny kvasiniek. Obsah horčíka v bunkách sa môže zvýšiť pridaním síranu horečnatého do živného prostredia alebo vodou s vyšším obsahom horčíka. To prichádza do úvahy hlavne v prevádzke, kde je vodný zdroj bohatý na horčík.

Ióny horčíka sú stimulátorom viacerých enzýmových procesov a sú známe najmä ako podporovateľ aktivity fosfatáz. V niektorých prípadoch ho možno dobre nahradiť mangánom alebo kobaltom, napr. pri stimulácii aktivity kokarboxylázy kvasiniek. Kryštalický síran horečnatý sa pridáva do všetkých syntetických živných pôd (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Zinok

Zinok v biologicky relevantnej podobe Zn^{2+} iónov, je zásadný ako katalytický kofaktor mnohých enzýmov, vrátane alkoholdehydrogenázy, alkalickéj fosfatázy a niekoľko karboxypeptidáz. Zinok tiež zohráva dôležitú úlohu v štruktúre enzýmov a mnohých monokatalytických bielkovín. Tento prvok zvyšuje rýchlosť rastu kvasiniek. Jeho optimálne množstvo v živnej pôde je 5-15 mol.dm⁻³. Pri jeho nedostatku sa zastavuje rast buniek, na druhej strane, pri jeho vysokej koncentrácii v prostredí pôsobí toxicky, pretože zinok ovplyvňuje priepustnosť membrány pre draslík (Stehlik-Tomas, et al. 2004).

Meď

Meď je tiež rozhodujúci dvojmocný kation kvasiniek, pôsobí ako kofaktor niektorých enzýmov, ako je cytochrómoxydáza, lakkáza, a Ca,Zn-superoxiddizmutáza. Optimálna koncentrácia v živnej pôde je v rozsahu 1-10 mol.dm⁻³ (Stehlik-Tomas, et al. 2004).

Mangán

Kvasinkové bunky potrebujú mangán ako zásobné stopové prvky o koncentrácií 2-10 mol.dm⁻³. Pri jeho nedostatku dochádza k zastaveniu rastu (Stehlik-Tomas, et al. 2004).

3.8 Rastové látky

3.8.1 Vitamíny ako rastové látky

Niektoré mikroorganizmy potrebujú okrem základných živín, ako zdrojov biogénnych prvkov, ešte určité organické zlúčeniny, ktoré sa uplatňujú ako prekursor na syntézu zložiek bunkového materiálu alebo priamo ako jeho zložky. Všetky organické látky tohto typu označujeme súborne ako rastové faktory. Do kategórie rastových faktorov patria najmä tieto typy organických zlúčenín: vitamíny, aminokyseliny, amíny, vyššie mastné kyseliny, puríny a pyrimidíny, prípadne aj ďalšie látky (Krasowka, et al. 2003).

Pre správnu funkciu enzýmových systémov a celkovú aktivitu kvasiniek sú dôležité vitamíny. Veľká väčšina vitamínov (inositol, biotín, kyselina listová, kyselina pantoténová) je v mušte prítomná v dostatočných koncentráciách. Kritickými rastovými faktormi sú tiamín (vitamín B₁) a biotín, ktoré oba patria medzi sírne zlúčeniny (Furdíková, Malík, 2009).

Vitamíny sú dôležité na syntézu koenzýmov, na syntézu nukleových kyselín a pod. Niekedy však rastový faktor nemusí byť absolútne nevyhnutný. Ak napr. zablokovaná reakcia je niekde v začiatkových štádiách metabolickej dráhy, potom organický medziprodukt, ktorý je za touto blokovanou reakciou, sa môže uplatniť vo funkcii rastového faktora, pretože ho organizmus využije ako prekursor na syntézu koncového produktu (Kocková-Kratochvílová, 1986).

Medzi rastové látky patria predovšetkým vitamíny:

1.tiamín (B₁)- je metabolicky aktívny v podobe svojho pyrofosfátu ako koenzým takých enzýmov, ktoré prerušujú väzby medzi atómami uhlíka, napr. niektoré dekarboxylázy, transaldolázy, transketolázy.

2.biotín - ako koenzým sa uplatňuje v rozličných reakciách, ako karboxylácia, deaminácia niektorých aminokyselín, močovinový cyklus, metabolizmus mastných kyselín.

3.riboflavín – patrí medzi prekursorov veľkej skupiny zlúčenín – flavoproteínov. S najznámejšími z nich, flavinadeninmononukleotidom (FMN) a flavínadenín-dinukleotidom (FAD) sme sa oboznámili v súvislosti s oxidačno-redukčnými procesmi a s prenosom elektrónov pri aeróbnom dýchaní. Riboflavín funguje aj ako fotoreceptor pri fototropizme niektorých húb.

4.pyridoxín (B₆)- patrí do komplexu vitamínov B₆ spolu s pyridoxálom a pyridoxamínom. Pyridoxálfosfát je koenzýmom transamináz, ako aj dekarboxyláz aminokyselín a niektorých racemáz aminokyselín.

5.kyselina pantoténová – je súčasťou koenzýmu A. Zúčastňuje sa v metabolizme glycidov, lipidov a aminokyselín. Niektoré mikroorganizmy vyžadujú priamo kyselinu pantoténovú, kým iné potrebujú len jednu alebo dve zložky – kyselinu pantoovú a β-alanín.

6.nikotínamid – amid kyseliny nikotínovej je zložkou pyridínových nukleotidov (NAD⁺ a NADP⁺), ktoré sa uplatňujú v oxidačno-redukčných reakciách.

7.cyanokobalamíny – skupina vitamínu B₁₂ sa uplatňuje v podobe koenzýmov pri syntéze tymínu, pri transmetyláciách a izomerizáciách niektorých organických kyselín.

8.kyselina p-aminobenzoová – je zložkou kyseliny listovej, ktorá je prekursorom kyseliny tetrahydrolistovej, koenzýmu, ktorý sa uplatňuje pri prenose jednouchlíkatých zvyškov.

9.kyselina lipoová – je potrebná pri prenose vodíka a acylových skupín (Kocková-Kratochvílová, 1986).

Kvalitatívne a kvantitatívne zloženie vo vode rozpustných vitamínov B u kvasiniek *Saccharomyces* kultivovaných na rôznych živných médiách bola študovaná vysoko-účinnou kvapalinovou chromatografiou. Nové kmene *Saccharomyces oviformis* Y-2635 a *Saccharomyces Vini* F-5 kvasiniek kultivovaných v živných médiách s geotermálnou vodou sa líšili svojou biologickou hodnotou kvôli vysokej vnútrobunkovej koncentrácii riboflavínu, tiamínu, kyseliny nikotínovej, a kyseliny listovej (Viditto, 1988).

S. cerevisiae si tiamín dokáže syntetizovať sám, ale biotín potrebuje prijímať v hotovej podobe. Napriek tomu, nedostatok tiamínu v mušte spôsobuje zastavenie fermentácie a rastu kvasiniek. Nedostatok tiamínu v médiu môžu spôsobovať nesaccharomycétne kvasinky (*Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Metchnikowia pulcherrima*). Tieto druhy už za niekoľko hodín spotrebujú majoritnú časť vitamínu B1

v mušte a fermentácia sa tak môže zastaviť skôr, ako sa mušt zakvasí čistou kultúrou *S. cerevisiae*. Prídavok vitamínov do média podporuje rast a navýšenie biomasy. Použitím vitamínového preparátu sa zároveň znížia potrebné dávky oxidu siričitého, pretože optimálne živé kvasinky viažu podstatne menej SO₂ ako kvasinky s deficitom vitamínu B1 (Furdíková, Malík2009).

Autori Hahn-Hägerdal et al. (2005) kultivovali kvasinky *S. cerevisiae* v kultivačnom médiu za použitia biotínu, kyseliny nikotínovej, kyseliny pantoténovej, myo-inozitolu, pyridoxínu, tiamínu, kyseliny aminobenzoovej, kyseliny listovej, riboflavínu.

Tab. 1 Koncentrácia vitamínov vo vybraných živných pôdach podľa Hahn-Hägerdal (2005).

Vitamins (mg l⁻¹)				
	YP	DM	YNB	SC (YNB+Suppl)
Biotin	-	0,05	0,002	0,002
Kyselina pantoténová	-	1	0,4	0,4
Kyselina nikotínová	-	1	0,4	0,4
Myo-inozitol	-	25	2	2
Tiamin	-	1	0,4	0,4
Pyridoxín	-	1	0,4	0,4
Kyselina aminobenzoová	-	0,2	0,2	0,2
Riboflavín	-	-	0,2	0,2
Kyselina listová	-	-	0,002	0,002

YP- (yeast extract-peptone) kvasnicový peptónový extrakt

DM- (defined mineral medium) minerálne médium

YNB- (yeast nitrogen base) Kvasničné dusíkaté bázy

SC (YNB+Suppl)- (synthetic complete medium equivalent to supplemented) rovnocenne doplnená synteticko-kompletné médium

Optimálna koncentrácia tiamínu pre *S. cerevisiae* je 50–500 mg.dm⁻³. Vitamín B₁ sa do muštu pridáva vo forme tiamínhydrochloridu, najviac však v dávke 0,6 mg dm⁻³. Deficit biotínu spôsobuje inhibíciu fermentácie glukózy a fruktózy a zníženie syntézy mastných kyselín, DNA, RNA a celkových proteínov. V bunkovej stene klesá obsah manánov, narastá koncentrácia glukánov a krehkosť bunkovej steny sa zvyšuje. Pre

väčšinu kvasiniek je postačujúca koncentrácia biotínu v prostredí 1 mg.dm^{-3} , maximálny rast dosahujú pri koncentrácii 100 mg.dm^{-3} (Furdíková, Malík, 2009).

3.8.2 Aminokyseliny ako rastové látky

Aminokyseliny, ktoré majú významnú ako rastové látky: alanín, cysteín, leucín, izoleucín, lyzín, glycín, prolín, serín, metionín, fenylalanín, treonín, tryptofán, valín, arginín, histidín, tyrozín, kyselina glutámová, kyselina asparágová.

Aminokyseliny môžu byť zdrojom dusíka a uhlíka súčasne, preto sa často využívajú v živných pôdach v pomere, v akom sa nachádzajú v prírodných látkach, napr. v peptóne, hydrolyzáte kazeínu, v kvasničnom autolyzáte, sladine a podobne. Kvasinky však nevyužívajú všetky aminokyseliny rovnako dobre (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Vplyv rôznych aminokyselín, a to buď samostatne alebo v kombinácii, na rast *Saccharomyces cerevisiae*, bol skúmaný v podmienkach nedostatku biotínu. Hoci kyselina asparágová sama je stimulačná za týchto podmienok, kombinácia kyseliny asparágovej, tryptofánu, arginínu, leucínu, a metionínu je nevyhnutná, aby bunka rástla, a to aj v prítomnosti všetkých aminokyselín. Aminokyseliny ako tyrozín, izoleucín, glycín, valín, fenylalanín, alanín, histidín, a kyselina glutámová sú veľmi dôležité a sú schopné nahradiť kyselinu asparágovú, ale v podstate nemajú žiadny vplyv na čoho prítomnosť (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Kvasinkové bunky kultivované na živnej pôde s obsahom aminokyselín ako jediným zdrojom dusíka v prítomnosti optimálnej koncentrácie biotínu, dosiahli vrcholový rast. Po kultivácii bol následne pozorovaný v bunkách kvasiniek pokles koncentrácií všetkých aminokyselín okrem cysteínu. Alanín, arginín, aspartát, cysteín, glutamát, izoleucín, lyzín, metionín, serín, treonín a valín boli znížené o viac ako 50% po 26 alebo 43 hodinovom raste. (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Tab. 2 Optimálne množstvo niektorých aminokyselín v živnej pôde
(www.ncbi.nlm.nih.gov).

Aminokyselina	mg.100 cm ⁻³ média	Aminokyselina	mg.100 cm ⁻³ média
glycín	4,5	L-histidín	5,2
DL-valín	7,0	L-cystin	2,4
L-leucín	7,9	L-cysteín	2,4
DL-izoleucín	8,8	DL-treonin	7,9
kyselina aparágová	20,0	Kyselina L-glutámová	8,8
L-tryptofán	2,5	L-prolín	7,0
alanín	5,3	metionín	0,6
prolín	8,0	DL-serín	7,0
L-arginín	5,4	L-tyrozín	1,5

Záver

Rastové látky patria medzi faktory, ktoré sú pri stanovovaní určitého životného procesu kvasiniek určujúce a pre dosahovanie väčšej produkcie v niektorých prípadoch nevyhnutné.

S použitím rastových látok vieme účelovo ovplyvniť technologické postupy, majú nezastupiteľnú úlohu vo výžive kvasiniek a pochopenie ich vzájomného spolupôsobenia bude ešte dlhý čas vďačnou témou pre tých ktorí sa o to zaujímajú. Kultivačné prostredie obohatené o rastové látky umožňuje rýchlejšiu rast a plnohodnotnú výživu pre tvorbu čo najväčšieho podielu biomasy kvasiniek.

Použitie rastové látky pri kultivácii kvasiniek, nielen množstvo, ale aj kvalita a forma, majú podstatný vplyv na charakter fyziológie kvasiniek a sú jednou z možností, ktorá prináša nové výsledky pri výrobe zdravotne nezávadných potravín. Intenzita rastu biomasy kvasiniek a jej usmernenie sú neustálou výzvou pre spoločnosti, ktoré biotechnológie využívajú ako nosný program ich výrobnobchodnej činnosti.

Použitá literatúra

BENDO VÁ, O. - KAHLER, M. 1981. *Pivovarské kvasinky*. 1. vyd. Praha : SNTL, 1981. s. 14, 55, 61-63.

FURDÍKOVÁ, K. - MALÍK, F. 2009. Kolobeh síry vo víne. In *Vinič a víno*, roč. 8, 2009, č. 1, s. 6. ISSN 1335-7514.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. 2005. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. In *Microbial Cell Factories* [online]. 2005, vol. 4, no. 31 [cit. 2010-04-28]

KIDBY D,K. - DAVIES, R. 1970. Invertase and disulphide bridges in the yeast wall. In: *J. Gen. Microbiol.*, roč. 61, 1970, č. 3, s. 327-333.

KOCKOVÁ - KRATOCHVÍLOVÁ, A. 1982. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava : Alfa, 1982. 488 s.

KOCKOVÁ - KRATOCHVÍLOVÁ, A. 1986. *Kvasinky ve výskumu a praxi*. 2. vyd. Praha : Academia, 1986. 29-33 s. ISBN 81-1023- 861-7.

KOVÁČ, J. et al. 1990. *Spracovanie hrozna*. 1. vyd. Bratislava : Príroda, 1990. 78 s. ISBN 80-07-00313-4.

KRASOWKA, A. et al. 2003. Effect of antioxidants on *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in superoxide dismutases. In *Folia Microbiol*, roč. 6, 2003, č. 48, s. 754-560.

MARZULF, G. 2001. Metabolic Regulation in Fungy, In *Applied Mycology and Biotechnology*, 2001. 1. vyd. Amsterdam : Elsevier science B.V., ISBN 0-444-50657-8.

MAZÁŇ, M. - MAZÁŇOVÁ, K. - FARKAŠ, V. 2006. Bunková stena húb - výzva pre výskum nových antimykotík. In *Chemické listy*, roč. 100, 2006, č. 6, s. 433-439, ISSN 1213-7103.

MONTVTLLE, T. et al. 2005. *Food Microbiology an Introduction*. 2. vyd. Washington D.C.: ASM PRESS, 2005. s. 232-235. ISBN 1-55581-308-9.

REBROŠ, M. et al. 2005. Mikrobiálna produkcia palivového etanolu: Baktérie alebo kvasinky? In *Chemické listy*, roč. 99, 2005, č. 6, s. 402 – 409. ISSN 1213-7103.

ROSYPAL, S. et al. 2003. *Nový přehled biologie*. 1.vyd. Praha : Scienta, 2003, 318-321 s. ISBN 80-7183-268-5.

ŠEPELOVÁ, G. - CVENGROSCHOVÁ, M. - ŠMOGROVIČOVÁ, D. 2003. Vplyv technologických faktorov na fermentačnú aktivitu pivovarských kvasiniek. In *Bulletin potravinárskeho výskumu*, roč. 42, 2003, č. 3-4, s. 192-200. ISSN 0231-9950.

ŠEPICKÝ, M. – ŠUBÍK, J. 1992. *Genetika kvasiniek*. 2. vyd. Bratislava : VEDA, 1992. 312 s. ISBN 80-224-0396-2.

ŠILHÁNKOVÁ, S. 2002. *Mikrobiológia pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha : Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

ŠTEVLÍKOVÁ, T. et al. 1999. *Mikrobiológia, 1. časť*. 1. vyd. Nitra : SPU, 1999. 28 s. ISBN 80-7137-639-6.

ŠTEVLÍKOVÁ, T. et al. 2006. *Mikrobiológia, 2. časť*. 2. vyd. Nitra : SPU, 2006. s. 26-29. ISBN 80-8069-683-7.

ŠTURDÍK, E. - ZIGOVÁ, J. 1999. Bioinžinierske aspekty produkcie biomasy *Saccharomyces cerevisiae* ako zdroja špeciálnych proteínov. In *Biologické listy*, roč. 64, 1999, č., s. 35-40. ISSN 0366-0486.

STEHLIK-TOMAS, V. et al. 2004. Zn, Cu and Mn Enrichment in *S. cerevisiae*, In *Food Technology and Biotechnology*. Zagreb: University of Zagreb, roč. 2, 2004, č. 42, s. 115–120. ISSN 1330-9862.

STRACHOTOVÁ, D. et al. 2005. Role *Ato* transportéru v amoniakové signalizaci *S. cerevisiae*. In *Chemické listy*, roč. 99, 2005, č. 5, s. 386. ISSN 1213-7103.

TANČINOVÁ, D. et al. 2008. *Mikrobiológia potravín*. 2. vyd. Nitra: SPU, 2008, s. 15-16. ISBN 80-8069-425-7.

VIDITTO, V. et al. 1988. A syntetic Medium for *Saccharomyces cerevisiae*. In *Microbiologica*, roč. 2, 1988, č. 11, s. 143.

VRANÁ, D. 1986. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. 1. vyd. Praha: Academia, 1986. 376 s.

Internetové zdroje:

URL 1: <http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/kvasmikro/kvasmikro.html> [cit. 2010-03-26]. Dostupné na: <<http://www.sci.muni.cz>>.

URL 2: <http://www.pangamin.cz/web/clanek?klic=5> [cit. 2010-03-143].
Dostupné na: <<http://www.pangamin.cz>>.

URL 3: http://sk.wikipedia.org/wiki/Bunkov%C3%A1_stena [cit. 2010-01-23].
Dostupné na: <<http://cs.wikipedia.org>>.

URL 4: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky> [cit. 2010-01-23].
Dostupné na: <<http://cs.wikipedia.org>>.

URL 5: <http://www.iam.fmph.uniba.sk/web/sevcovicova/skripta/cge/pdf/genetika-celok.pdf> [cit. 2010-02-27]. Dostupné na: <<http://www.iam.fmph.uniba.sk>>

URL 6: <http://www.iam.fmph.uniba.sk/web/sevcovicova/skripta/cge/pdf/genetika-celok.pdf> [cit. 2010-03-03]. Dostupné na: <<http://www.iam.fmph.uniba.sk>>

URL 7: <http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/kvasmikro/kvasmikro.html> [cit. 2010-04-13]. Dostupné na: <<http://www.sci.muni.cz>>

URL 8: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC386215/pdf/jbacter0604-0069.pdf> [cit. 2010-04-02]. Dostupné na: <[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) >

URL 9: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC284856/pdf/jbacter0084-0275.pdf> [cit. 2010-03-03]. Dostupné na: <[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) >