

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V
NITRE**

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

2119272

**BETA-GLUKÁNY V KVASINKÁCH *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

2011

Bc. Monika Ertlová

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

**BETA-GLUKÁNY V KVASINKÁCH *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

Diplomová práca

Študijný program:	Biotechnológia
Študijný odbor:	2908800 biotechnológia
Školiace pracovisko:	Katedra biochémie a biotechnológie
Školiteľ:	Ing. Eva Szabová, PhD.

Nitra, 2011

Bc. Monika Ertlová

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Monika Ertlová týmto vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému: „Beta-glukány v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry. Daná diplomová práca nadväzuje na tématiku mojej bakalárskej práce s názvom „Význam a využitie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* v poľnohospodárstve a v potravinárskom priemysle“.

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

V Nitre 11. Apríla 2011

.....
Monika Ertlová

Pod'akovanie

Touto cestou si dovoľujem poďakovať vedúcej bakalárskej práce Ing. Eve Szabovej, PhD., za ochotu, odbornú pomoc, pripomienky, cenné rady a trpezlivosť pri vypracovaní mojej diplomovej práce.

Vďaka patrí aj mojej celej rodine, ktorá ma podporovala pri písaní tejto práce.

Abstrakt

Jednou z najvýznamnejších a najčastejšie využívaných kvasiniek v biotechnológiách a v priemysle a to, predovšetkým pre svoju schopnosť skvasovať cukry na etanol a ako zdroj nutrične hodnotných bielkovín, je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. V práci sme sa zamerali najskôr na biochemickú charakteristiku tejto kvasinky a jej využitie v potravinárskom priemysle, poľnohospodárstve a farmácii. Našu pozornosť sme však upriamili na využitie kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ako dôležitého zdroja beta-glukánov. Beta-glukány sú unikátne prírodné polysacharidy, ktoré tvoria prevažnú časť bunkovej steny týchto mikroorganizmov. Patria do skupiny fyziologicky aktívnych zlúčenín nazývaných biologické modifikátory odpovede. β -D-glukány majú značnú imunomodulačnú aktivitu, môžu zvýšiť prirodzenú obranu hostiteľa väzbou na špecifické makrofágové receptory a aktivácia makrofágov má za následok zvýšenie protinádorovej aj antibakteriálnej činnosti. Cieľom danej diplomovej práce bolo okrem stanovenia množstva beta-glukánov v kvasinkách, zistiť aj vplyv koncentrácie glukózy v živnom médiu na obsah spomínaných polysacharidov v troch rôznych kmeňoch kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*.

Kľúčové slová: kvasinky, *Saccharomyces cerevisiae*, beta-glukány

Abstract

One of the most important and the most frequently used yeast in biotechnology and industry and, in particular for its ability acetify sugars to ethanol and as a source of nutritionally valuable protein, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this work we focused first on the biochemical characteristics of yeast and its use in the food industry, agriculture and pharmacy. Our attention, however, was drawn to the use of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as an important source of beta-glucans. Beta-glucans are unique natural polysaccharides which form the major part of the cell wall of these organisms. They belong to a group of physiologically active compounds called biological response modifiers. β -D-glucans have significant immunomodulatory activity, may increase the host's natural defenses by binding to specific macrophage receptors and activation of macrophages resulting in increased antitumor and antibacterial activity. The aim of the thesis was in addition to determining the quantities of beta-glucans in yeast, to identify the impact of glucose concentration in a nutrient medium on the content of the above-mentioned polysaccharides in three different strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, beta-glucans

Obsah

Zoznam skratiek a značiek	9
Slovník termínov	10
Úvod	11
1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí	12
1.1 Kvasinky	12
1.2 Charakteristika rodu <i>Saccharomyces</i>	15
1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ako modelový organizmus.....	16
1.4 Morfológia a taxonomické zaradenie kvasiniek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.5 Cytológia kvasiniek.....	18
1.5.1 Bunková stena	18
1.5.2 Cytoplazmatická membrána.....	20
1.5.3 Cytoplazma a bunkové organely	21
1.6 Rozmnožovanie, výživa a vzťah ku kyslíku	23
1.7 Základné regulačné mechanizmy	25
1.8 Využitie kvasiniek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.8.1 Využitie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pre produkciu biomasy	26
1.8.2 Využitie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pri výrobe droždia.....	27
1.8.3 Využitie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pri výrobe piva.....	28
1.8.4 Využitie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pri výrobe vína.....	29
1.8.5 Využitie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na tvorbu organických kyselín.....	30
1.8.6 Využitie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v krmivách prežúvavcov.....	30
1.8.7 Odstránenie mykotoxínov kvasinkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
1.8.8 Využitie kvasiniek na výrobu beta-glukánu.....	33
1.9 Beta-glukán – všeobecná charakteristika	34
1.10 Chemické zloženie, štruktúra a rozpustnosť β -D-glukánu.....	35

1.11 Beta-glukán v kvasinkách	36
1.11.1 β -1,3-glukán	37
1.11.2 β -1,6-glukán	37
1.12 Mechanizmus účinku beta-glukánov.....	38
1.13 Nežiaduce účinky beta-glukánov	40
2 Cieľ práce.....	41
3 Metodika práce a metódy skúmania.....	42
3.1 Výber vhodného produkčného kmeňa	42
3.2 Podmienky kultivácie.....	42
3.3 Stanovenie β -1,3/1,6-glukánu v kvasinkách <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
3.3.1 Meranie celkového glukánu	43
3.3.2 Meranie α -glukánu	44
3.3.3 Výpočet β -glukánu	45
4 Výsledky a diskusia	47
Záver	54
Zoznam použitej literatúry	56

Zoznam skratiek a značiek

ang. - anglicky

β -glukán - beta-glukán

CO₂ - oxid uhličitý

DKZ - doplnková kŕmna zmes

DMSO - dimetylsulfoxid

DNA - deoxyribonukleová kyselina

ED - Entner-Dourdoroffova metabolická dráha

g - gram

HCl - kyselina chlorovodíková

kg - kilogram

KOH - hydroxid draselný

konc. - koncentrovaná

lat. - latinsky

LDL cholesterol – Low-Density Lipoprotein cholesterol (lipoproteín s nízkou hustotou)

μm - mikrometer

Mg²⁺ - horečnaté ióny

mg - miligram

min. - minúta

MODS - syndróm multiorgánového zlyhania (multiple organ dysfunction syndrome)

NK bunky - prirodzené zabíjače (natural killers)

nm - nanometer

NO³⁻ - dusičnany

ot.min⁻¹ - otáčky za minútu

RNA - ribonukleová kyselina

S. cerevisiae - *Saccharomyces cerevisiae*

sp. - subspecies (poddruh)

SR - Slovenská republika

t - tona

TODS - syndróm toxického organického prachu (toxic organic dust syndrome)

Slovník termínov

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) patrí spolu s kyselinou ribonukleovou medzi nukleové (jadrové) kyseliny. Nukleové preto, lebo sa nachádza predovšetkým v bunkovom jadre. DNA je nositeľkou genetickej informácie bunky, riadi rast a regeneráciu bunky. V chromozómoch je DNA uložená ako špirála - dvojzávitnica.

Detrit je drvina odumretých buniek, drť, rozpadajúca sa odumretá organická hmota v ekosystéme.

Koagulácia (zrážanie krvi) je zložitý proces, v ktorom sa krv premieňa na tuhú zrazeninu. Je dôležitou časťou hemostázy (zabránenie stratám krvi z poškodených ciev). Pri poranení cievy je poškodená cievna stena pokrytá zrazeninou tvorenou krvnými doštičkami a fibrínom, čím sa krvácanie zastaví a následne začne oprava poškodenej krvi.

NK – bunky (z angl. Natural killers, teda prirodzené zabijáče) sú jedným z typov bielych krviniek, patriace do skupiny lymfocytov, sú schopné zabíjať nádorové bunky a bunky napadnuté vírusmi.

Komplement (doplňok) je súbor asi 30 proteínov, ktoré sú syntetizované v neaktívnom stave. Najdôležitejšími proteínmi komplementu sú sérové zložky C1 až C9. Jednotlivé zložky sa aktivujú kaskádovito klasickou, lektínovou alebo alternatívnou cestou. Biologické účinky odvodené z aktivovaného komplementu zahŕňajú elimináciu patogénov, odstránenie imunokomplexov a reguláciu imunitnej odpovede.

Ribonukleová kyselina (RNA) je nukleová kyselina tvorená jedným vláknom kovalentne naviazaných ribonukleotidov. Je biochemicky rozlíšiteľná od DNA vďaka prítomnosti dodatočnej hydroxylovej skupiny pripojenej ku každej pentózovej molekule reťazca a prítomnosti uracilu namiesto tymínu. Jednou z hlavných funkcií RNA je skopírovať genetickú informáciu z DNA (transkripcia) a fyzicky ju preniesť na miesto, kde dôjde k jeho preloženiu (translácia) na výsledný proteín (priamo túto funkciu plní iba jedna trieda RNA, mediátorová RNA (mRNA)).

Zrážacia (koagulačná) kaskáda je tvorená sériou reakcií, v ktorých sú proenzýmy (neaktívne prekurzory enzýmov) serínových proteáz a ich glykoproteínové pro-kofaktory aktivované, a tieto aktívne zložky potom katalyzujú ďalší stupeň kaskády. Konečným dôsledkom kaskády je vytvorenie fibrínovej siete.

Úvod

Kvasinky, ako mikroorganizmy, sprevádzali človeka už od staroveku. Človek ich využíval na prípravu jedál skôr ako ich prítomnosť vôbec tušil alebo o nich čokoľvek vedel. Ich úloha pri kvasení sa však odhalila iba v minulom storočí. Patria medzi najjednoduchšie eukaryotické organizmy na Zemi, často využívané ako model pre štúdium rôznych životných procesov, ktoré prebiehajú aj u vyšších organizmov (Mazáň; Mazáňová; Farkaš, 2005). V súčasnosti sa kvasinky stali ekonomicky i kvantitatívne najpoužívanejšími mikroorganizmami v priemysle. K priemyselne najvýznamnejším patrí rod *Saccharomyces*, ktorý sa využíva vo veľkom rozsahu najmä v potravinárskom priemysle.

Z viac ako 500 druhov známych kvasiniek je najdlhšie používaný a najvýznamnejší druh *Saccharomyces cerevisiae* (Vodrážka, 1991). Ide pravdepodobne o jednu z najčastejšie využívaných kvasiniek, ktorej potrebu pri pečení chleba a varení piva poznali už v dávnej minulosti. Názov *Saccharomyces* má grécky pôvod a znamená „skvasovanie sladu“, zatiaľ čo názov *cerevisiae* pochádza z latinčiny a znamená „pivný“. Tento druh patrí k jedným z najintenzívnejšie skúmaných eukaryotických organizmov molekulárnej a bunkovej biológie, rovnako ako aj prokaryotický organizmus *Escherichia coli*. Ako eukaryotický organizmus má podobne komplexnú vnútornú bunkovú štruktúru ako bunky rastlín a živočíchov, avšak svojou štruktúrou bunky je tiež porovnateľná s ľudskými bunkami. Množstvo proteínov (napr. proteíny pre bunkový cyklus alebo pre signalizáciu) dôležitých v biológii človeka bolo po prvýkrát objavených práve u *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*, 2009). Najčastejšie je označovaná ako pekárská, pivovarská, vínná alebo liehovarnícka kvasinka, podľa toho v akom odvetví sa jej kmene využívajú.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je okrem iného, primárnym zdrojom β -glukánov, a to najmä v európe a USA (Větvička, 2004). β -glukány sú hlavné zložky bunkovej steny kvasinky *Saccharomyces* (Kim; Yun, 2006). Oni stimulujú náš imunitný systém a tým nás chránia pred pôsobením patogénnych mikroorganizmov a pred škodlivým efektom prírodných toxínov a karcinogénov (Chen; Seviour, 2007). Patria do skupiny fyziologicky účinných látok, ktoré sa označujú ako modifikátory biologickej odpovede (biological response modifiers, BRMs) (Novák, 2007). Ich pozitívny vplyv na zdravie ľudí a zvierat je popisovaný viac ako 50 rokov (Freimund et al., 2003).

1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí

1.1 Kvasinky

Kvasinky sú pravdepodobne jedny z najstarších domestikovaných organizmov. Ľudia používali kvasinky na fermentáciu a pekárstvo počas dlhého obdobia. Archeológovia, študujúci Egyptské ruiny, objavili mlecie kamene a nádoby na pečenie kvaseného chleba a rovnako i nákresy 4000 rokov starých pekární a pivovarov. V roku 1680 Holanďan Anton van Leeuwenhoek pravdepodobne ako prvý pozoroval kvasinky, ale v tom čase ich nepovažoval za živé organizmy, ale skôr len za akési globulárne štruktúry. V roku 1857 francúzsky mikrobiológ Lois Pasteur dokázal, že alkoholové kvasenie je spôsobené živými kvasinkami (Tančinová; Labuda, 2009).

Kvasinky zaraďujeme z botanického hľadiska medzi huby – vzhľadom k ich veľkosti medzi mikroskopické huby (Kocková–Kratochvílová, 1982), ktoré rastú v kolóniách z jednotlivých buniek s priemerom 5 až 10 μm (Görner; Valík, 2004). Pôvod húb sa vysvetľuje rôzne. Za predchodcov húb sa najčastejšie považujú fotosyntetické riasy, ktoré stratili schopnosť tvoriť chlorofyl, a tým aj schopnosť fotosyntézy (napr. *Prototheca*). Napriek tomu, že spôsobom života sa *Prototheca* veľmi podobá deliacim kvasinkám, považujú iní za predchodcov húb červené riasy (Kocková–Kratochvílová, 1982).

Termín „kvasinka“ je popisným termínom a vzťahuje sa na každú hubu, ktorá sa reprodukuje pučaním. Väčšinou sa jedná o nemelanizované (biele alebo červené) kvasinky, ale patria sem i zástupcovia melanizovaných, tzv. čiernych kvasiniek. Schopnosť tvoriť kvasinkové štádiá za normálnych alebo len za špecifických podmienok prostredia (dimorfizmus) majú tiež mnohé druhy, rody či vyššie jednotky systematicky značne vzdialených skupín. Kvasinkovité štádiá tvoria za určitých podmienok aj niektorí zástupcovia triedy *Zygomycetes* alebo primitívnejšie formy v oddelení *Basidiomycota* (Tančinová; Labuda, 2009).

Slovenské pomenovanie kvasinky vzniklo od slovesa kvasiť, no v mnohých cudzích jazykoch je ich pomenovanie odvodené od slovesa dvíhať (latinsky levare, francúzsky lever, španielsky levantar, nemecky heben a pod.).

Anglický názov yeasts, holandský gist, grécky zetos má zase bližšie k pene vznikajúcej pri kvasení (Kocková–Kratochvílová, 1982).

Vo všeobecnosti predstavujú kvasinky jednobunkové (unicelulárne) alebo mnohobunkové eukaryotické organizmy patriace do ríše pravých húb (*Fungi*), ktoré sa (až na niektoré výnimky) rozmnožujú nepohlavne pučaním. Tak ako aj ostatné huby sú kvasinky chemoorganotrofné. Hlavným zdrojom uhlíka sú cukry: hexózy (napr. glukóza a fruktóza) alebo disacharidy (napr. sacharóza a maltóza). Niektoré druhy môžu metabolizovať pentózy, alkoholy a organické kyseliny (Tančinová; Labuda, 2009). Rastú v širokom rozmedzí pH (pH 3 až 11) ako aj teplôt (0 až 45°C). Určité druhy rastú aj pri -10°C a pri hodnote pH len 1,5 (Görner; Valík, 2004).

Kvasinky si buď vyžadujú prítomnosť kyslíka pre aeróbne dýchanie alebo sú schopné rásť za anaeróbných podmienok, hoci majú aeróbny spôsob získavania energie (fakultatívne anaeróbne). Neexistujú však kvasinky, ktoré by boli striktne anaeróbne (Tančinová; Labuda, 2009). Za anaeróbných podmienok majú teda schopnosť premeniť svoj metabolizmus na fermentačný a pri silne obmedzenom raste bunkovej hmoty produkovať etanol a oxid uhličitý (Görner; Valík, 2004).

Tvar buniek kvasiniek súvisí so spôsobom vegetatívneho rozmnožovania. Najčastejší tvar je elipsoidný, prípadne vajcovitý alebo guľovitý. Niektoré rody tvoria dlhé pretiahnuté bunky, vyskytuje sa však aj tvar citrónový, trojuholníkovitý a valcovitý. Tvar buniek a ich veľkosť sú do určitej miery ovplyvnené kultivačnými podmienkami a vekom buniek. Šírka buniek väčšiny kvasiniek sa pohybuje v rozmedzí 3-6 μm (Šilhánková, 2008).

Väčšina z nich sa rozmnožuje pučaním buniek, ale sú aj také, ktoré sa delia priehradkami, t. j. priečnym delením. Ďalšia skupina vytvára pravé mycélium (pravé vlákna – hýfy, tvoriace artrokonídie) alebo nepravé hýfy, pseudomycélium (pseudohýfy sa tvoria pučaním do súvislých retiazok). Dnes prevláda názor, že kvasinky sú redukované formy iných húb, pričom redukcia zasiahla hlavne pohlavné procesy. Takéto formy možno hľadať medzi askomycétami, bazídiomycétami a deuteromycétami. Medzi deuteromycéty sa radia prechodne také formy, pri ktorých sa nezistil nijaký prejav sexuality (dovtedy, pokiaľ sa pri nich sexualita nezistí), preto sa môžu deuteromycéty považovať vlastne za stratové formy askomycét alebo bazídiomycét (Kocková–Kratochvílová, 1982).

V prírode sú kvasinky a kvasinkovité organizmy veľmi rozšírené, voľným okom neviditeľné. Pretože majú hlavne sacharolytické schopnosti, vyskytujú sa predovšetkým na materiáloch obsahujúcich cukry, t. j. na ovocí, hlavne bobuľovom a kôstkovom (hrozno, slivky a pod.) a na cukornatých potravinách. Ďalej sa nachádzajú v kvetných nektároch,

výronoch stromov, v pôde, vo vzduchu, v črevnom trakte ľudí, zvierat a niektorého hmyzu, napr. včiel (Šilhánková, 2008).

Šíria sa rôznymi prenášačmi, hlavne hmyzom, vetrom a pod. Vo vzduchu je najviac kvasiniek v dobe kvitnutia stromov a v dobe dozrievania sliviek a hrozna. Toto obdobie preto prináša najväčšie riziko vzdušnej kvasinkovej kontaminácie v droždiarňach (Šilhánková, 2008).

Pokiaľ sa kvasinky dostanú do cukrových roztokov, spôsobujú samovoľné kvasenie. Táto ich schopnosť bola prv využívaná vo veľkom meradle. Medovina, víno, 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 súčasne s ovocím prichádza do tekutiny dostatočné množstvo kvasiniek s vhodnými vlastnosťami, ktoré po rozmnožení usmerňujú kvasenie.

Podobne ako u chleba, kde dobrý zákvas má priaznivý vplyv na priebeh kysnutia, spoznalo sa tiež u piva, že kvasenie závisí od kvality zákvasu. Sledovaním vhodných vlastností sa postupne vypestovali druhy, ktoré zaručovali rovnakú kvalitu výrobku a podstatne rýchlejšie kvasenie. Dlhodobým pestovaním za rovnakých podmienok a stálym výberom dobre kvasiacich typov vznikli kvasinky určitých ustálených vlastností, ktoré sa fyziologicky líšili od kvasiniek v prírode a nemohli byť s nimi pomiešané. K presnému rozlíšeniu však prišlo omnoho neskôr, až po vynáleze mikroskopu a Hansenovom objave prípravy čistých kultúr z jednej bunky. Dnes nazývame kvasinky zámerne pestované v rôznych kvasných priemyselných odvetviach kvasinkami kultúrnymi, a ostatné kvasinky zase divokými (*Pivovarské kvasnice – všední zázrak*, [cit. 2008.03.23]).

V histórii ľudskej populácie majú kvasinky významné miesto z ekonomického, sociálneho i zdravotného hľadiska. Sú často popisované ako najstaršie „domestikované organizmy“, ktoré sú po tisícročia využívané k výrobe alkoholických nápojov a kysnutého pečiva. Výroba piva predstavuje pravdepodobne prvú svetovú biotechnológiu.

Dnes kvasinky zastávajú celosvetovo prvé miesto medzi priemyslovými mikroorganizmami. Sú široko využívané v rade oblastí vedy, technológií aj medicíny. Niektoré druhy sú nezastupiteľné v potravinárskom a farmaceutickom priemysle, iné sú využívané ako biologické modelové systémy pre štúdium všeobecných regulácií metabolizmu eukaryotických buniek, ďalšie pôsobia ako faktory vyvolávajúce ochorenia.

V súčasnej dobe sú kvasinky okrem tradičných výrob tiež využívané v rade ďalších aplikácií. Geneticky modifikované kvasinky sú producentmi farmakologických preparátov

pri prevencii i liečbe ochorení. V budúcnosti možno predpokladať ešte väčšie využitie kvasiniek v ďalších priemyslových oblastiach ako je obnova energie, environmentálna biotechnológia a využitie technológií rekombinantnej DNA v medicíne (*Kvasinkovité mikroorganizmy*, [cit. 2008.03.26]).

Dnes je známych, respektíve popísaných približne 100 rodov s viac než 700 druhmi kvasiniek (Tančinová; Labuda, 2009).

1.2 Charakteristika rodu *Saccharomyces*

Rod *Saccharomyces* patrí medzi technologicky najdôležitejšie rody aj keď obsahuje iba sedem druhov (Šilhánková, 2008). Druhy tohto rodu sú schopné skvasovať väčšinou niekoľko druhov sacharidov (Tančinová et al., 2008). Tieto kultúrne kvasinky patria k najlepšie prebádaným mikroorganizmom a predstavujú nepochybne ekonomicky najvýznamnejšiu skupinu mikroorganizmov používaných v priemysle. Množstvo kvasiniek produkovaných každoročne pivovarskými a liehovarskými technologickými postupmi tvorí rádovo milióny ton (*Kvasinkovité mikroorganizmy*, [cit. 2008.03.26]).

Rod *Saccharomyces* zaviedol v roku 1838 Meyen a bola to jedna z prvých objavených kvasiniek. Tento rod však definoval až v roku 1870 Rees. Pre *Saccharomyces* je charakteristický vegetatívny spôsob rozmnožovania prebiehajúci multilaterálnym pučaním, bunky sú sférické, elipsoidné, cylindrické alebo pretiahnuté. Výnimočne je vytvárané pseudomycélium, vegetatívne rastúce bunky sú prevažne diploidné alebo polyploidné. Menej časté je pohlavné rozmnožovanie vedúce k tvorbe askospór (Čejková, [cit. 2008.03.26]).

Pohlavné rozmnožovanie je somatogamické a vytvorené vrecká sú homozygotné, pričom nevznikajú z askogénnych hýf a nemajú otvárací aparát. Vo vrecku sú jednobunkové askospóry obličkovitého tvaru, v počte 1-4 (Tančinová; Labuda, 2009).

Tento rod je fermentatívny, tiež je však schopný realizovať respiráciu (Čejková, [cit. 2008.03.26]). Druhy z tohto rodu sú schopné skvasovať väčšinu cukrov. Nikdy však nevyužívajú laktózu ako zdroj uhlíka ani NO_3^- ako zdroj dusíka (*Kvasinkovité mikroorganizmy*, [cit. 2008.03.26]).

Najčastejšie používaným a najdôležitejším druhom z rodu *Saccharomyces* je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (Tančinová et al., 2008). Označuje sa tiež ako pekárská, liehovarnícka alebo vrchná pivovarská kvasinka. *Saccharomyces cerevisiae* je

poprednou priemyslovou kvasinkou využívanou najmä pri produkcii jedál a fermentácii nápojov. Pravdepodobne je to najodolnejšia kvasinka, akú máme v súčasnej dobe k dispozícii (Querol; Fleet, 2006).

1.3 *Saccharomyces cerevisiae* ako modelový organizmus

Niekoľko druhov kvasiniek, predovšetkým však *Saccharomyces cerevisiae* bolo úspešne použitých na štúdium genetiky a bunkovej biológie. Toto štúdium má veľké využitie, pretože bunkový cyklus kvasiniek je veľmi podobný bunkovému cyklu ľudských buniek, a preto základné molekulárne mechanizmy DNA replikácie, rekombinácie, bunkového delenia a metabolizmu sú zhruba rovnaké. Taktiež množstvo proteínov, dôležitých v ľudskej biológii, bolo najprv objavených štúdiom ich homológov pri kvasinkách, napr. proteíny bunkového cyklu, signalizačné proteíny a proteín-spracovávajúce enzýmy (Tančinová; Labuda, 2009).

Kvasinka *S. cerevisiae* bola prvým eukaryotickým organizmom, ktorý bol osekvenovaný (bola prečítaná jeho genetická informácia zapísaná v DNA) a jej genóm je stále v centre pozornosti vedcov, ktorí skúmajú základné princípy genetiky a fyziológie. Genóm *S. cerevisiae* sa skladá z približne 13 000 000 párov báz a z 6 275 génov, aj keď len okolo 5 800 z nich sa považuje za skutočne funkčné gény. *Saccharomyces cerevisiae* má spoločných s človekom asi 23% genómu. Tieto znalosti vytvorili tiež užitočný základ pre klonovanie génov a prípravu vektorov (Kvasinky, 2010).

1.4 Morfológia a taxonomické zaradenie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*

Z taxonomického hľadiska zaradíme *Saccharomyces cerevisiae* do ríše *Fungi* (huby), keďže kvasinky sú vlastne mikroskopické huby, ktoré dokážu skvasovať substrát (Števlíková et al., 2006). Tieto kvasinky patria do oddelenia *Ascomycota*, pretože tvoria askospóry v askoch (vreckách), ktoré sú nahé a produkované priamo na hýfach alebo na premenených, či spojených pučiach bunkách. Netvorí však askokarpy – plodničky (Tančinová; Labuda, 2009). Ich presné taxonomické zaradenie je :

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

Druh *Saccharomyces cerevisiae* má elipsoidné alebo guľovité bunky, štatistické rozpätie dĺžok je 3,7-9,7 μm a širok 2,6-6,4 μm . Vytvára rudimentárne alebo stromčekovité, bohato vetvené pseudomycélium. Články mycélia môžu presiahnuť aj 30 μm , ale pravé hýfy nevytvára (Rebroš et al., 2005). Askospóry sú obličkovité a tvoria sa vo vrecku po 2-4 (Tančinová; Labuda, 2009).

Vzhľad a konzistencia kolónií môže byť rôzna. Náter je krémový, svetlohnedý, hladký, lesklý, ale môže byť aj skladaný, kráterovitý, drsný a kučeravý (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen, [cit. 2007.03.15]).



Obr. 1: Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (Kvasinky, 2010).

1.5 Cytológia kvasiniek

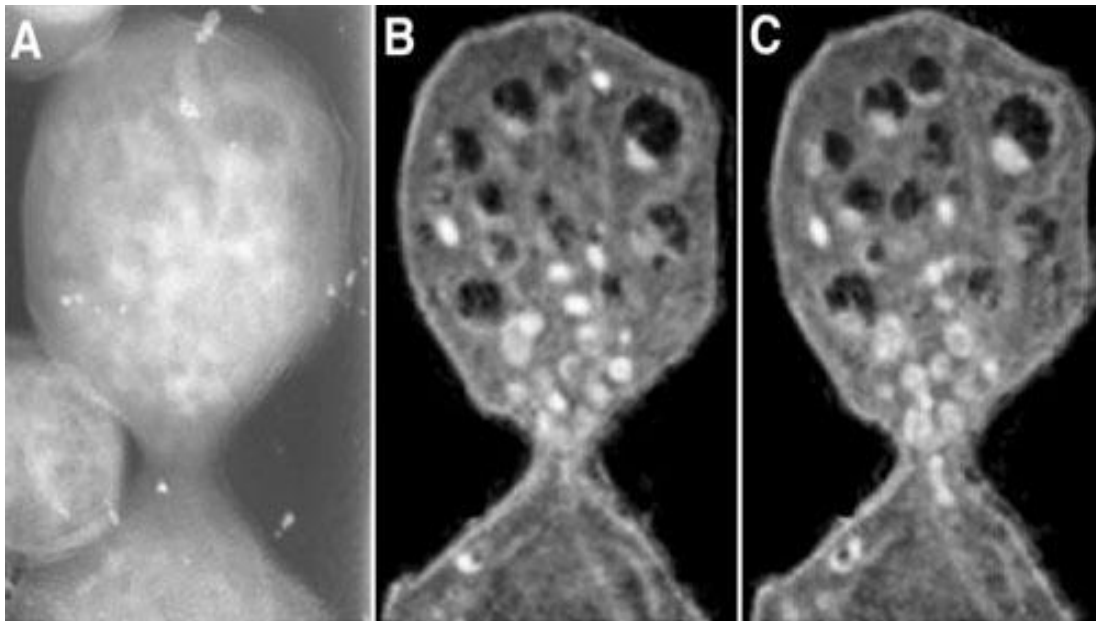
Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sú teda eukaryotické jednobunkové mikroorganizmy. Povrch bunky je obklopený silnou bunkovou stenou, pod ktorou sa nachádza cytoplazmatická membrána uzatvárajúca cytoplazmu s rôznymi štruktúrami, ktoré sa v nej nachádzajú. Sú to jadro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, vakuoly a Golgiho aparát. Okrem membránových útvarov sa v cytoplazme kvasiniek nachádzajú i zreteľné zrníčka zásobných látok (Šipický; Šubík, 1992).

1.5.1 Bunková stena

V bunkách kvasiniek je cytoplazmatická membrána obklopená vrstvou, ktorá sa nazýva bunková stena. Bunková stena udržuje tvar bunky, avšak je flexibilná a môže dynamicky meniť svoju štruktúru, čím umožňuje bunke kvasinky rýchlo meniť tvar (Bacic; Fincher; Stone, 2009). Hrá tiež dôležitú úlohu pri sexuálnom rozpoznaní medzi bunkami opačného párovacieho typu, flokulácii, sporulácii a odpovedi na stres (Mazán; Mazánová; Farkaš, 2006). Veľkými pórmi v stene môžu voľne prechádzať všetky zlúčeniny okrem vysokomolekulárnych zlúčenín, ako sú polysacharidy a bielkoviny (Šilhánková, 2008).

Na povrchu steny kvasiniek sú viditeľné jazvy po pučaní, ktoré sa v elektrónovom mikroskope javia ako mierne vyvýšené prstence (pozri obr. 2). Tieto jazvy označujeme ako jazvy zrodu. Jazvy môžeme farbiť primulinom a následne pozorovať vo svetelnom mikroskope fluorescenčnou technikou, pretože po zafarbení silne fluoreskujú. Bunky rodu *Saccharomyces* nikdy nepučia v mieste, kde už predtým pučali, takže počet jaziev nám súčasne určuje aj vek bunky (Šilhánková, 2008).

Kompozícia a štruktúra bunkovej steny kvasiniek sa mení v závislosti od druhu. Taktiež ju ovplyvňuje zloženie média a kultivačné podmienky (Kim; Yun, 2006). Aguilar-Uscanga a Francois zistili, že viac ako 50% sušiny a obsahu polysacharidov sa mení v závislosti od zdroja uhlíka, dusíka, teploty a režimu kultivácie bunky (Jaehrig et al., 2008).



Obr. 2: Pučiaca *Saccharomyces cerevisiae* (Kvasinky, 2010).

Bunková stena kvasiniek predstavuje približne 15 až 30% hmotnosti sušiny bunky a 25 až 50% objemu bunky (Lipke; Ovalle, 1998) a skladá sa v prevažnej miere najmä z polysacharidov (85%) a proteínov (15%) (Lesage; Bussey, 2006). Polysacharidy bunkovej steny možno rozdeliť na tri hlavné skupiny: polyméry mannózy, ktoré sú kovalentne spojené s peptidmi (mannoproteíny, cca 40% sušiny bunkovej steny), polyméry glukózy (β -D-glukán, cca 60% sušiny steny) a polyméry N-acetylglukóزامínu (chitínu, cca 2% sušiny bunkovej steny) (Liu et al., 2008). Štruktúra bunkovej steny kvasiniek môže byť následne rozdelená na dve časti: vonkajšiu a vnútornú vrstvu. Vonkajšia vrstva pozostáva z mannoproteínov (Kim; Yun, 2006), ktoré vyčnievajú z povrchu bunky (Mazáň; Mazáňová; Farkaš, 2006). Oni zachytávajú periplazmické proteíny a zabraňujú prístupu cudzích enzýmov do bunky (Kim; Yun, 2006). 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 (Jigami; Odani, 1999). Tieto bočné mannánové reťazce sú zodpovedné za hydrofilné vlastnosti steny a mohli by sa zúčastňovať pri zadržiavaní vody a ochrane pred vysychaním (Rast et al., 2003).

Vnútorná vrstva pozostáva z β -glukánu, ktorý nesie zodpovednosť za mechanickú odolnosť a chitínu (Kim; Yun, 2006). Proteíny bunkovej steny sú kovalentne viazané k β -1,3-glukán–chitínovej sieti buď priamo cez alkalicky citlivú väzbu – ASL (alkali

sensitive linkage) proteíny, alebo nepriamo cez β -1,6-glukán-glykozylofosfatidylinozitolovú (GPI) kotvu (Mazáň; Mazáňová; Farkaš, 2006). Zloženie bunkovej steny *Saccharomyces cerevisiae* je možné vidieť aj v tabuľke 1.

Poznanie zloženia a biosyntézy bunkovej steny je dôležité z hľadiska boja proti najčastejšie sa vyskytujúcim patogénom, akými sú *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus fumigatus*. Je dokázané, že biosyntéza β -1,3-glukánu a chitínu zahŕňa esenciálne exocelulárne enzýmové pochody, a keďže sa ani jedna z týchto zložiek nenachádza v bunkách cicavcov a rastlín, sú unikátnym terčom pre výskum a vývoj napr. nových antimykotík (Mazáň; Mazáňová; Farkaš, 2006).

Tabuľka 1: Zloženie bunkovej steny v *Saccharomyces cerevisiae*

Makromolekula	Hmotnosť sušiny, %	Miesto syntézy	Základná forma	
			SP	vetvenie
Mannoproteíny	35-40	Sekrečná cesta	200 ^a	vysoké
β -1,6-glukán	5-10	(PM)?	140	vysoké
β -1,3-glukán	50-55	PM	1500	stredné
Chitín	1-2	PM	190 ^b	lineárny

^aN - viazané; ^b chitín zo zárodočnej jazvy; bunková stena známeho patogéna *Candida albicans* má podobné zloženie; SP – stupeň polymerizácie, PM – plazmatická membrána; miesto syntézy β -1,6-glukánu nie je dostatočne preukázané; údaje tu prezentované sa môžu líšiť v závislosti od rastových podmienok (Klis et al., 2002).

1.5.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána kvasiniek niekedy nazývaná plazmalema má podobné zloženie a funkciu ako cytoplazmatická membrána baktérií. Je pomerne tenká, s hrúbkou 7,5 až 8 nm, zložená z lipidov a proteínov. Vytvára početné vychlípeniny vybiehajúce do cytoplazmy. Je voľne priepustná iba pre malé molekuly bez náboja a preto vytvára

osmotické rozhranie medzi bunkou a vonkajším prostredím. Podobne ako u baktérií je sídlom transportných mechanizmov, umožňujúcich jednak príjem určitých látok bunkou, jednak transport látok z bunky do prostredia. Na rozdiel od baktérií však neobsahuje dýchacie enzýmy a systém oxidačnej fosforylácie (Šilhánková, 2008).

1.5.3 Cytoplazma a bunkové organely

Cytoplazma mladých buniek kvasiniek sa v svetelnom mikroskope javí ako priehľadná, homogénna hmota. U starších buniek sa v nej objavujú zrníčka a jemná alebo väčšia vakuolizácia (Šilhánková, 2008).

Endoplazmatické retikulum sa nachádza väčšinou tesne pod plazmalemou a má podobné zloženie ako v bunkách rastlín a živočíchov. Spravidla sa spája s jadrovou membránou a v niektorých kvasinkách preberá funkciu diktyozómov. Na rezoch bunky vidno, že vytvára cisterny, lamely alebo tubuly. Skladá sa z dvoch membrán, ktoré uzatvárajú vrstvu vodnej kvapaliny – enchylému (Kocková-Kratochvílová, 1982). Obidve tieto membrány majú pomerne veľké póry a vzhľadom pripomínajú membránu jadra. Na vonkajšom povrchu oboch membrán sú početné zrníčka polyzómov, t. j. agregátov ribozómov, v ktorých sa syntetizujú bielkoviny (Šilhánková, 2008).

Ribozómy sú globulárne organely v priemere 20 až 30 nm veľké, ktoré charakterizuje sedimentačná Svedbergova konštanta 70 S až 80 S. V kvasinkách rovnako ako v živočíšnych a rastlinných bunkách môžu útvary 80 S disociovať na podjednotky s 60 S a 40 S. Tieto zmeny sú reverzibilné. Pri znižovaní koncentrácie Mg^{2+} sa môžu získať častice až s 5 S, ale táto zmena už nie je reverzibilná (Kocková-Kratochvílová, 1982). Podjednotky ribozómov majú nasledovné charakteristiky: 40 S podjednotka obsahuje 30 rôznych bielkovín a jedno vlákno 18 S rRNA, 60 S podjednotka obsahuje 50 rôznych bielkovín a dve vlákna 25 S alebo 28 S a okrem toho 5 S a 5,8 S rRNA. Keďže jedna podjednotka je väčšia a druhá menšia, sedimentujú pri rôznych rýchlostiach centrifúgy (Uhrín; Uhrín, 1995).

Ďalej sa v cytoplazme kvasiniek nachádzajú **mitochondrie**. Sú to štrukturálne útvary veľmi rozmanitého tvaru (guľovité, valcovité až vláknité) a rozličnej veľkosti. Sú široké 0,3 až 1 μm a dlhé až 3 μm (Šilhánková, 2008). Nachádzajú sa v cytoplazme v rôznom počte. Počet mitochondrií v bunke a ich tvar závisia nielen od druhu bunky, ale aj od fázy bunkového a životného cyklu a od spôsobu pestovania kultúry. Uvádza sa, že

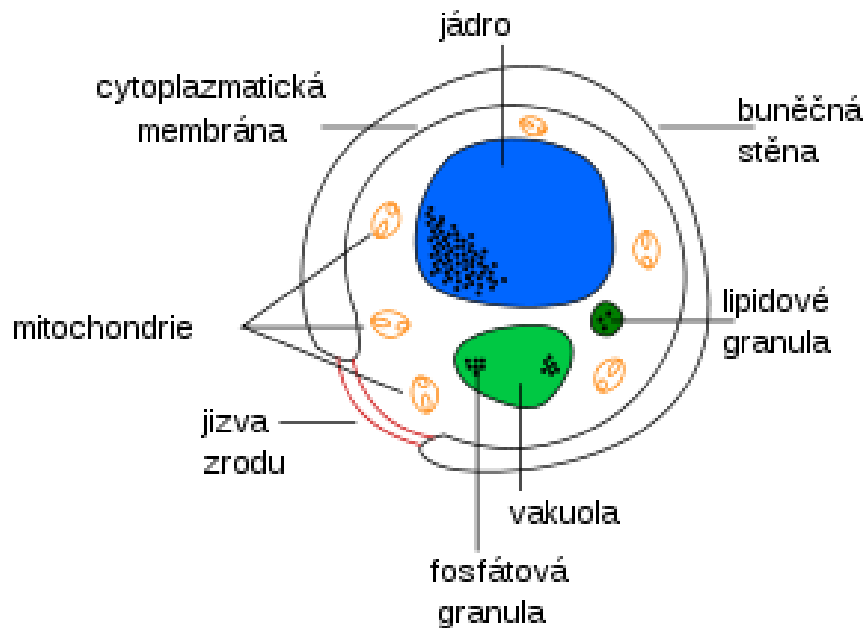
v diploidných bunkách *S. cerevisiae* je ich 15 až 29, v haploidných 7 až 17 a zaberajú asi 12% celkového objemu bunky tejto kvasinky (Kocková-Kratochvílová, 1982). Mitochondrie majú hladkú vonkajšiu membránu, ktorá je vďaka pórom mimoriadne dobre priepustná pre polárne látky. Vnútoraná membrána tvorí vychlípeniny, ktoré smerujú do vnútra mitochondrie (tzv. mitochondriálne kristy). Vo vnútri sa nachádza mitochondriálny matrix (Rosypal et al., 2003). Mitochondrie sa skladajú hlavne z bielkovín, lipidov a fosfolipidov. Obsahujú tiež RNA a malé množstvo DNA, ktorá je nositeľom mimojadrovej dedičnosti kvasiniek. Ďalej sú mitochondrie sídlom dýchacích enzýmov a systému oxidačnej fosforylácie (Šilhánková, 2008).

Vakuoly sú veľmi nápadné a dôležité organely v bunkách kvasiniek. Spravidla býva v bunke jedna veľká vakuola, najčastejšie guľatá a niekoľko malých vakuol (Kocková-Kratochvílová, 1982). U starších buniek niekedy vakuola vyplňa takmer celý priestor bunky. Obsahuje roztok prepúšťajúci svetlo a preto má vo svetelnom mikroskope rovnaký odtieň ako pozadie zorného poľa (odtiaľ pochádza aj jej názov, lat. *vacuus* znamená prázdny). Vo vnútri vakuoly sú uložené hydrolytické enzýmy ako proteínázy, ribonukleáza a esteráza. Vakuoly majú teda v bunke zrejme podobnú funkciu ako lyzozómy u vyšších organizmov, t. j. sú miestom, v ktorom dochádza k rozpadu tých štruktúr bunky, ktoré sa v bunke neustále rozkladajú a obnovujú a ktoré majú krátky polčas rozpadu (mRNA, niektoré enzýmy a pod.). Okrem toho obsahujú vakuoly ešte polyfosfáty a veľkú zásobu draselných iónov, aminokyselín a purínov, takže sú rezervoárom látok, ktoré sa práve nezúčastňujú metabolizmu (Šilhánková, 2008).

Ďalším membránovým útvarom v cytoplazme kvasiniek je **Golgiho aparát**, ktorý sa nachádza len v eukaryotických bunkách. V normálne rastúcich bunkách kvasiniek existuje typický Golgiho aparát len vo forme diktyozómov, t. j. sploštených cisterien s uvoľňujúcimi sa mechúrikmi na oboch protiľahlých póloch cisterien (Kocková-Kratochvílová, 1982). Predpokladá sa, že funkciou tohto aparátu je transportovať prekursorov bunkovej steny z cytoplazmy cez cytoplazmatickú membránu (Šilhánková, 2008).

Jadro kvasiniek je od cytoplazmy oddelené dvojitou jadrovou membránou s veľkými pórmí a je umiestnené približne v strede bunky. V svetelnom mikroskope je zreteľné iba po špeciálnom farbení. Rozlíšenie chromozómov v jadre kvasiniek je aj pomocou elektrónovej mikroskopie tenkých rezov buniek veľmi obtiažne. Počet chromozómov sa preto odvodzuje z výsledkov genetických štúdií. U kvasinky *S. cerevisiae*

bolo doposiaľ zistených 16 chromozómov v haploidnom jadre. Diploidné jadro má dvojnásobný počet chromozómov, pretože každý chromozóm sa v ňom vyskytuje dvakrát. Dĺžka DNA jednotlivých chromozómov sa značne líši. V jadre (t. j. nukleoplazme) druhu *Saccharomyces cerevisiae* sa vyskytuje tiež nízkomolekulárna DNA (dĺžky 2 μm), ktorá má kruhovú štruktúru a je obdobou plazmidov baktérií. Tento „2 μm plazmid“ sa vyskytuje v diploidnom jadre v 60-100 kópiách a využíva sa v génomom inžinierstve (Šilhánková, 2008).



Obr. 3: Schéma bunky kvasinky (Kvasinky, 2010).

1.6 Rozmnožovanie, výživa a vzťah ku kyslíku

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sa rozmnožujú nepohlavne pučaním, kedy v dôsledku pučania dochádza pri starších bunkách k deformáciám. Materská bunka pučí, púčik (dcérska bunka) sa zväčšuje, kým nedosiahne veľkosť pôvodnej materskej bunky. Vtedy sa zvyčajne od nej oddelí (Minárik; Navara, 1986).

Pri pučaní je malá dcérska bunka – púčik – spojená kanálikom s materskou bunkou. Pred pučaním dochádza k splývaniu blán endoplazmatického retikula a následne k jeho deleniu, ďalej k opakovanému deleniu vakuol a ku zmene tvaru mitochondrií. Po začiatku tvorby púčika do neho vstupujú drobné vakuoly a mitochondrie. Súčasne začne mitotické delenie jadra a jeho migrácia k púčiku. S jadrom prechádzajú do novo vytvoreného púčika

tiež ďalšie zložky cytoplazmy. Následne sa cytoplazmatickou membránou uzavrie kanálik medzi materskou a dcérskou bunkou a v púčiku sa intenzívne syntetizuje a rozširuje endoplazmatické retikulum. Po vytvorení bunkovej steny medzi materskou a dcérskou bunkou, narastá veľkosť púčika a spojením drobných vakuol do jedinej vakuoly je pučanie ukončené (Šilhánková, 2008).

Ak je rozmnožovanie rýchle, napr. pri prebytku rastových alebo výživných látok, nedosiahnu dcérske bunky veľkosť materských buniek. Oddelujú sa skôr, takže v kultúre je veľa buniek menších rozmerov. Materské bunky pučia viackrát, počas svojej existencie aj 23 – 43 krát. Keď sa dcérske bunky neoddelia, vznikajú zväzky buniek, tzv. kríčky, charakteristické napr. pre vínne kvasinky (Minárik; Navara, 1986).

Celý cyklus bunkového delenia je u *Saccharomyces cerevisiae* pod kontrolou zhruba sedemdesiatich génov, z ktorých niektoré majú regulačnú funkciu. Tieto gény sú väčšinou označované ako CDC (z angl. cell division cycle) a ich teplotne senzitivne mutanty umožnili štúdium kontroly tohto cyklu a jeho regulácie (Šilhánková, 2008).

Popri vegetatívnom rozmnožovaní sa kvasinky rozmnožujú aj pohlavným spôsobom, ktorý všeobecne charakterizuje splývanie dvoch haploidných buniek a ich jadier za vzniku diploidnej bunky – zygóty. Zygóty vegetatívnym, mitotickým delením jadier môžu vytvoriť diploidné potomstvo, ktorého bunky sú schopné meiózou vytvoriť haploidné pohlavné spóry - askospóry. Spóry môžu mitózou vytvoriť vegetatívne haploidné pohlavné potomstvo, ktoré je opäť schopné navzájom konjugovať a vytvárať zygóty. V životnom cykle kvasiniek takto dochádza k pravidelnému striedaniu haploidnej a diploidnej fázy buniek, pričom obe fázy sú časovo rovnocenné (Šipický; Šubík 1992). *Saccharomyces cerevisiae* však pučí po vytvorení askospór najprv haploidne, po kopolácii a karyogamii pučí diploidná zygota ďalej, takto vznikajú súbežne vedľa seba haploidne ako aj diploidne pučiace bunky (Görner; Valík, 2004).

Saccharomyces cerevisiae sú chemoorganotrofné organizmy, čo znamená, že nemôžu rásť bez prítomnosti organických zdrojov uhlíka. Organické látky pre ne súčasne predstavujú zdroje energie (Števlíková et al., 2006). Skvasujú glukózu, sacharózu, maltózu, galaktózu a čiastočne alebo úplne rafinózu. Nikdy však nevyužívajú laktózu ako zdroj uhlíka a NO_3^- ako zdroj dusíka (Tančinová et al., 2008).

Vo vzťahu ku kyslíku sú tieto kvasinky fakultatívne anaeróbne. Sú schopné žiť aj za aeróbnych aj za anaeróbných podmienok. Za prítomnosti kyslíka získavajú energiu oxidačnou fosforyláciou a za anaeróbných podmienok fosforyláciou na substrátovej

úrovni, ktorá je spojená s procesmi kvasenia. K väčšiemu nárastu biomasy však dochádza za aeróbných podmienok (Števlíková et al., 2006).

1.7 Základné regulačné mechanizmy

Hlavným zdrojom uhlíka a energie pre bunku kvasiniek sú teda sacharidy. Sú základom pre biochémiu a fyziológiu bunky ako aj pre jej rozmnožovanie. Centrálny význam medzi nimi má glukóza. V kvasinkách zohráva glukóza veľmi dôležitú regulačnú úlohu. Je zodpovedná za represiu syntézy mnohých enzýmov glukoneogenézy, citrátového cyklu a respirácie. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sú glukózo-senzitívne kvasinky, teda produkujú etanol aj za aeróbných podmienok v prípade, že glukóza je v nadbytku.

Teda, charakteristický pre tieto kvasinky je tzv. „Crabtree“ efekt. Tento spôsobuje produkciu etanolu aj pri nadbytku kyslíka, ak majú kvasinky dostatok glukózy. Táto vlastnosť sa sledovala počas kontinuálnych fermentácií. Etanol nebol produkovaný v prípade, keď zried'ovacia rýchlosť bola nižšia ako istá kritická rýchlosť. Príčinou takéhoto správania sa je limitovaná respiračná kapacita kvasiniek, ktorá sa prejaví pri nadbytku glukózy v aeróbných podmienkach spomalením rastu a produkciou etanolu. Je to dôsledok chýbajúcej kontroly glukózového transportu cez bunkovú membránu. Táto limitovaná respiračná kapacita kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* sa nazýva aj respiračná blokáda.

Komplikovanosť už základného metabolizmu kvasiniek, ako aj jeho ďalšie pokračovanie v mitochondriách naznačuje, že spôsob regulácie na enzýmovej úrovni nie je jednoduchý (Zigová; Šturdík 1999).

1.8 Využitie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je v porovnaní s ostatnými druhmi kvasiniek využívaná v takej prevahe, že v rade prác je pojem kvasinka považovaný za synonymum k *S. cerevisiae*. Existoval mylný predpoklad, že význam tejto kvasinky v budúcnosti poklesne, pretože produkuje iba minimálne množstvo komerčne zaujímavých sekundárnych metabolitov (neprodukuje žiadne antibiotiká). Táto kvasinka je však

využívaná predovšetkým pre svoju schopnosť skvasovať cukry na etanol a oxid uhličitý. Cukry sú metabolizované enzýmami glykolýzy a ED dráhy (Čejková, [cit. 2008.03.26]).

Saccharomyces cerevisiae a jej špeciálne upravené kmene majú široký rozsah využitia. Využívajú sa pri výrobe piva, vína a ďalších alkoholických nápojov, technického etanolu, pečiva a v súčasnosti aj pre získavanie mikrobiálnych bielkovín (Vodrážka, 1991).

Tieto kvasinky produkujú aj organické kyseliny, intermediáty citrátového cyklu, ktoré sa využívajú ako významné potravinárske aditíva (Kaclíková, 1996). V posledných rokoch sa tiež tieto mikroorganizmy používajú aj ako doplnky do krmív prežúvavcov, tzv. probiotiká (Meixner, 2001).

Okrem toho sa kvasinky využívajú pri príprave enzýmov, vitamínov, lipidov, rôznych ochucovadiel a pod. (Šipický; Šubík, 1992). Špeciálne kmene *S. cerevisiae* sa používajú napr. na výrobu ergosterolu, t. j. provitamínu vitamínu D, ktorý po ožiarení ultrafialovým svetlom poskytuje vitamín D. Ergosterol sa izoluje z buniek kvasiniek (Šilhánková, 2008). Druh *Saccharomyces cerevisiae* dnes patrí k priemyselne najvýznamnejším druhom kvasiniek (Šipický; Šubík, 1992) a ich význam z priemyselného hľadiska úmerne narastá s pokrokom modernej molekulárnej genetiky. Do budúcnosti sa predpokladá nárast dopytu po vhodných geneticky modifikovaných druhoch *S. cerevisiae* pre odvetvie produkcie biopalív, nápojov a pekárstva alebo pre výrobu biotechnologických produktov ako sú napríklad enzýmy a farmaceutické produkty (Schuller; Casal, 2005).

1.8.1 Využitie *Saccharomyces cerevisiae* pre produkciu biomasy

Mikrobiálna biomasa je zdrojom bielkovín, vitamínov, fosfolipidov atď. Cieľom jej výroby je získať produkt s vysokým obsahom požadovanej zložky.

Jej výroba bola spočiatku presadzovaná v krajinách, ktoré neprodukujú iné, hlavne rastlinné zdroje bielkovín, avšak komplexné využitie buniek mikroorganizmov nakoniec dosiahlo uplatnenie vo výžive, zdravotníctve i pri príprave krmív. Biomasa kvasinkových organizmov obsahuje 40 – 60% bielkovín, má vysoký obsah vitamínov, hlavne komplexu B a aminokyselín. Kvasinky možno využívať pre krmne účely a tiež pre účely ľudskej výživy. V druhom prípade použitia je treba venovať pozornosť sterilizácii média, jeho zloženiu, dodržiavaniu sterilných podmienok a testovaniu produkčných mikroorganizmov.

Dusíkatá bilancia biomasy závisí predovšetkým od prostredia, v ktorom sa vyrába. Z celkového obsahu dusíkatých látok (vyjadreného ako bielkoviny) je 70–80% hmotnosť čistých bielkovín. Vo všeobecnosti sa kvasinky vyznačujú nižším obsahom sírnych aminokyselín, ako cysteín a metionín, v porovnaní s bielkovinami živočíšneho pôvodu.

Okrem výhod má biomasa kvasiniek aj nejaké nedostatky, ako nestráviteľnosť bunkových stien a pomerne vysoký obsah nukleových kyselín, predovšetkým RNA. Ich obsah je v korelácii s obsahom bielkovín a pohybuje sa v rozmedzí 8 – 15% sušiny. S rastúcou rastovou rýchlosťou sa tento obsah zvyšuje. Maximálna denná dávka pre človeka predstavuje 2 g nukleových kyselín, čo zodpovedá asi 20 g sušiny mikrobiálnej biomasy.

Saccharomyces cerevisiae je klasickým mikroorganizmom, ktorý sa využíva pre potravinárske účely. Jeho biomasa sa vyrába z potravinárskej suroviny štandardným spôsobom a po vysušení sa uplatňuje ako prídavok v rade potravinárskych odborov (*Využití kvasinek pro produkci biomasy*, [cit. 2007.10.13]).

1.8.2 Využitie *Saccharomyces cerevisiae* pri výrobe droždia

Potravinový kódex SR definuje pekárske droždie ako kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* vyrobené ich rozmnožovaním v médiu pripravenom z melasy, príslušných živín a pomocných látok (*Tretia časť 22. hlava - Droždie a sušené pivovarské kvasnice*, 2000). Kmene *Saccharomyces cerevisiae* používané pri výrobe pekárskeho droždia vyžadujú vyrovnanosť tvaru a veľkosti buniek a tiež stálosť ich technologických vlastností (Šilhánková, 2008).

Pekárske droždie sa pripravuje aeróbnou fermentáciou okyslených melasových zápar obohatených amónnymi soľami a fosfátom. Zápary sa prevzdušňujú sterilným stlačeným vzduchom privádzaným ku dnu kvasných tankov a aeróbny metabolizmus je zaistený opakovanými prítokmi zápary, takže sa bunky rozmnožujú pri nízkych koncentráciách cukru v prostredí. Aj tak sa však pri výrobe pekárskeho droždia produkuje aj určité množstvo etanolu vzniknutého v dôsledku čiastočnej hexózovej represie dýchania (Šilhánková, 2008).

Cieľom technologického postupu výroby droždia je získanie čo najväčšieho množstva biomasy. Vyžaduje sa preto rýchle množenie a čo najmenšie alkoholové

kvasenie, pretože zdroj uhlíka a energie má byť maximálne využitý k tvorbe biomasy. Kultivácia prebieha za striktné aeróbných podmienok a uplatňuje sa hlavne dýchanie. Kvasinky nemôžu aglutinovať, majú minimálne absorbovať farbivá (vzhľad droždia) a nemajú mať sklon k autolýze (trvanlivosť droždia) (*Pekárske kvasinky v moderných biotechnológiách*, [cit. 2008.03.23]).

1.8.3 Využitie *Saccharomyces cerevisiae* pri výrobe piva

Pekárskym kvasinkám sú veľmi príbuzné tzv. vrchné pivovarské kvasinky (Šilhánková, 2008). Tieto 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 bublinkami CO₂ 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. Oproti vrchným kvasinkám však majú nižšiu teplotnú odolnosť a nižšiu schopnosť sporulácie. Spodné kvasinky sú zaraďované do druhu *Saccharomyces uvarum* (predtým *Saccharomyces carlsbergensis*) avšak vznik vitálneho a stabilného potomstva po krížení s vrchnými pivovarskými, pekárskymi a droždiarskymi kvasinkami ukázal, že ide o zástupcov jediného druhu, a preto mnohí autori zaraďujú tieto kvasinky do druhu *Saccharomyces cerevisiae* (Tančinová et al., 2008).

Saccharomyces cerevisiae (spolu so *Saccharomyces carlsbergensis* a *Brettanomyces* sp.) je teda jedným z najvýznamnejších druhov využívaných v pivovarníctve. Pivá, pri výrobe ktorých sa využívajú kvasinky vrchného kvasenia sa nazývajú „ales“ a z tohto dôvodu sa tieto kvasinky nazývajú aj ako „ale kvasinky“. Kvasinky vrchného kvasenia nie sú schopné fermentovať niektoré druhy cukrov, výsledkom čoho je, že pivo je sladšie a sýtejšie (*Saccharomyces cerevisiae*, 2009).

Z hľadiska technológie výroby sa ako rozhodujúca sleduje predovšetkým schopnosť skvasovať mladinu, flokulácia a sedimentácia, rozmnožovanie buniek a vplyv na organoleptické vlastnosti piva. Taktiež fyziologický stav kvasiniek je ďalším z dôležitých parametrov, ktoré nepriamo ovplyvňujú kvalitu finálneho produktu. Pri skladovaní neuzatvoreného nepasterizovaného piva pri vysokej teplote dochádza k oxidačným procesom a tým ku znehodnoteniu produktu. Cieľom je pripraviť pivo

vysokej organoleptickej stability. Efektivita fermentácie, charakter a kvalita konečného produktu sú spojené s využitím nepoškodených kvasiniek. Vplyv na toto poškodenie majú práve fyziologické podmienky pivovarských kvasiniek, ktoré nepriamo ovplyvňujú produkciu organických kyselín, esterov, vyšších alkoholov, aldehydov a iných metabolitov (*Pivovarské kvasinky v moderných biotechnológiách*, [cit. 2008.03.26]).

1.8.4 Využitie *Saccharomyces cerevisiae* pri výrobe vína

Druhovú špecifitu kvasiniek mladých i starších vín je pomerne úzka a špecifická, čo vyplýva z prirodzenej selekcie odolných a z potlačenia menej tolerantných druhov počas kvasenia a po ňom (Minárik; Navara, 1986). Kvasinky používané pri výrobe vína premieňajú cukor, prítomný v hrozňovej šťave alebo v mušte, na alkohol. Bežne sa vyskytujú na hrozne, viditeľné ako práškovitý povlak na ich povrchu. Fermentácia môže prebiehať s touto pôvodnou (divokou) kultúrou, resp. kultúrami, avšak môže to viesť k nepredvídateľným výsledkom v závislosti na presnom type kvasinkových druhov, ktoré sú prítomné. Z tohto dôvodu sa do muštu pridávajú čisté kultúry kvasiniek, ktoré rýchlo prevládnu vo fermentačnom procese, potlačia divoké kmene kvasiniek a zaisťujú spoľahlivú a očakávanú fermentáciu. Najčastejšie pridávané vínné kvasinky sú kmene *Saccharomyces cerevisiae*, aj keď nie všetky kmene sú vhodné. Rôzne kmene *S. cerevisiae* majú rôzne fyziologické a fermentatívne vlastnosti (Tančinová; Labuda, 2009).

Saccharomyces cerevisiae sú teda typické vínné kvasinky, ktoré sa nachádzajú najmä v počiatočnej fáze kvasenia bez ohľadu na ekologické podmienky vinohradníckej oblasti. Produkujú nad 10 objemových % alkoholu, maximálne však 18 objemových %. Zodpovedajú za začiatok spontánneho kvasenia muštu a rmutu. Vyskytujú sa najmä u mladých vín, pretože sú odolné voči vyššej koncentrácii alkoholu. Okrem toho, že sa tieto kvasinky nachádzajú na prírodných stanovištiach a zúčastňujú sa spontánneho kvasenia muštu však môžu spôsobiť i kontamináciu vína. Hoci ich nepovažujeme za pravé kontaminanty, vo vínach môžu zodpovedať za nežiaducu aktivitu, ktorá sa prejavuje v zákaloch alebo aj v druhotnom kvasení vína (Minárik; Navara, 1986).

V posledných rokoch s pokrokom modernej molekulárnej genetiky boli získané početné špecializované vínné druhy *S. cerevisiae*, vlastniace širokú škálu optimalizovaných a nových enologických vlastností, vyhovujúcich náročnej, modernej,

víno produkujúcej praxi. Odhalenie komplexnosti transkriptómu a proteómu rozhodne prispeje k rozšíreniu vedomostí o genetickom zložení komerčných druhov kvasiniek a bude viesť k vylepšeniu vínného druhu pomocou genetického inžinierstva (Schuller; Casal, 2005)

1.8.5 Využitie *Saccharomyces cerevisiae* na tvorbu organických kyselín

Organické kyseliny, významné potravinárske aditíva, produkujú kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ako intermediáty citrátového cyklu. Kyselina fumárová, jablčná a jantárová predstavujú esenciálne chuťové zložky vín. Približne 70% organických kyselín, ktoré sa nachádzajú v saké (japonské ryžové víno), vrátane kyseliny jablčnej a jantárovej, produkujú kvasinky počas fermentácie.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* syntetizujú organické kyseliny hlavne dráhami citrátového cyklu, ktorý je lokalizovaný v mitochondriách. Mechanizmus produkcie ďalších organických kyselín v daných kvasinkách nie je ešte celkom objasnený. Selekcia vhodných kmeňov kvasiniek umožňuje modifikovať senzorické vlastnosti vín, a tým je dôležitá pre ich kvalitu. Pre racionálne využitie kvasiniek ako priemyselných mikroorganizmov produkujúcich cielene požadované intermediáty svojho metabolizmu, je nevyhnutné štúdium regulácie metabolizmu ich buniek. Biochemické mutanty *Saccharomyces cerevisiae* významne prispievajú k prehĺbovaniu poznatkov o ich štruktúre, funkcii a regulácii ich metabolizmu (Kačíková, 1996).

1.8.6 Využitie *Saccharomyces cerevisiae* v krmivách prežúvavcov

V posledných rokoch sa používanie kvasinkových kultúr v krmných dávkach stáva každodennou skutočnosťou. Zvláštna pozornosť sa pritom venuje druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Objasnenie spôsobu, ako tento druh pôsobí v organizme a zákaz používania antibiotika avoparcínu poskytli farmárom nástroj na zvyšovanie úžitkovosti zvierat a návratnosti investícií prirodzenou cestou (Lukáčsová, 2001).

Prvým pozitívnym vplyvom kvasiniek je odčerpanie kyslíka, ktorého vnikajú pažerákom do žalúdka desiatky litrov. Kyslík pôsobí inhibične na celulolytické baktérie, avšak činnosťou kvasiniek je tento plyn spotrebovaný. Daná činnosť je však záhubou pre kvasinky samotné, pretože v bachore neprežijú, „udusia sa“ a pri ďalšom kŕmení je

potrebné ich pridať znovu. Okrem toho sú kvasinky producentom kyseliny jablčnej, ktorá priaznivo stimuluje gramnegatívne bachorové baktérie *Streptococcus ruminantium*.

Vedci často zisťujú výrazný nárast neamoniakálneho dusíka v bachore prežúvavcov kŕmených kvasinkami. Mechanizmus pôsobenia však zatiaľ nie je úplne známy. Jedným z vysvetlení by mohlo byť, že kvasinkové kultúry obsahujú peptidy o dĺžke asi 400 až 650 daltonov, ktoré stimulujú rast celulolytických baktérií a môžu byť metabolickým aktivátorom umožňujúcim naštartovanie exponenciálneho rastu. Tieto kvasinky tiež vnášajú do bachora prežúvavcov peptidy, biologicky aktívne látky – vitamíny a aminokyseliny - minerálne látky a celý rad ďalších cenných substancií. Výsledkom celého reťazca reakcií je intenzívnejší rozklad bunkových stien, čo má za následok vyšší príjem krmiva a lepšiu stráviteľnosť (Meixner, 2001).

Príkladom toho, že kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* použité ako doplnok výživy majú pozitívny vplyv na prežúvavce, je ich použitie v doplnkovej kŕmnej zmesi (DKZ) pre kone. Zakomponovaním týchto kvasiniek do DKZ sa zaznamenáva prínos v lepšom využití energie krmiva tým, že stimuluje rozvoj baktérií mliečneho kvasenia a pomáha premene kyseliny mliečnej, vzniknutej trávením, na prchavé mastné kyseliny, ktoré sú zdrojom až 50% energie pre kone. Okrem toho majú vplyv aj na metabolizmus minerálnych látok. Zvyšujú až o 20% využitie vápnika obsiahnutého v krmive. Súhrnne, zakomponovanie týchto kvasiniek do krmiva zlepšuje efekty trávenia a tým sa okrem zvýšenia dostupnej energie zlepši i rast koní (*Moderná výživa športových a chovných koní*, [cit. 2007.04.03]).

Ďalším príkladom je zaradenie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* do výživy dojníc, u ktorých môže eliminovať napr. výskyt bachorových indigescií. Obdobie po otelení a včasná laktácia sú najkritickejším obdobím v živote dojníc, pretože ich nutričné požiadavky nie sú adekvátne pokryté. V tomto období sa zvyšuje nárast mliečnej úžitkovosti a na chovateľa sú kladené vysoké nároky na reprodukciu. Dojnice však nie sú schopné prijímať toľko krmiva, koľko by potrebovali, pretože veľkosť bachora bola potlačená rastom plodu v posledných mesiacoch otelenia. Dojnice sa tak dostávajú do negatívnej energetickej bilancie, čo vedie k náhlej lipomobilizácii a výskytu subklinických a klinických ketóz. Pokiaľ chovatelia ešte navyše pristupujú k opatreniu zvýšenia koncentrácie kŕmnej dávky, môžu často navodiť bachorovú acidózu. Jedným z riešení, ako môžeme eliminovať bachorové indigescie či ketózu, je zaradiť do výživy živé kvasinkové kultúry *Saccharomyces cerevisiae* 1026 od firmy Alltech pod názvom YeaSacc 1026. Táto pivovarská kvasinka bola vyselektovaná na základe šestnásťročného výskumu (in vitro a in

vivo) z 200 kmeňov kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pre jej špecifické funkcie v bachore. Kmeň 1026 je biochemicky a geneticky definovaný, uložený v Národnej zbierke kvasinkových kultúr v Anglicku a je označený EÚ ako n. CBS 493.94. YeaSacc1026 je jediná kvasinka registrovaná v EÚ pre kŕmenie teliat a koní. Jej používanie vedie ku zvýšeniu koncentrácie a aktivity fyziologických baktérií v bachore, čo sa prejavuje stabilizáciou bachorového pH, zvýšeným príjmom krmiva, zlepšením bachorového trávenia kŕmnej dávky a dokonalejším využitím vlákniny. Zvýšená kvantita živín produkovaných v bachore vedie k lepšej konverzii krmiva a následne k eliminácii negatívnej energetickej bilancie u kráv pri skorej laktácii a k eliminácii výskytu ketóz (Berka; Křivka; Hulík, 2002).

1.8.7 Odstránenie mykotoxínov kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*

Odkedy sa vo výžive zvierat využívajú v oveľa väčšej miere krmivá rastlinného pôvodu, v mnohých prípadoch sa v nich nachádzajú mykotoxíny, ktoré môžu spôsobovať rôzne problémy. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* môžu okrem svojej pozitívnej funkcie na bakteriálnu mikroflóru zažívacieho traktu tiež viazať a detoxikovať mykotoxíny v krmive. Podľa odhadov je 25% obilia na svete kontaminovaného mykotoxínmi. Obsah vláknitých húb sa mení podľa regiónu a v závislosti od podmienok riadenia a uskladnenia. Zamorenie môže ovplyvniť tiež niektoré živiny v rastlinnom krmive a viesť k represii úžitkovosti alebo dokonca k prejavom otravy. Kultúrne kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* boli testované na detoxikačné vlastnosti proti mykotoxínom, čo by umožnilo detoxikáciu krmiva skôr, než je v tenkom čreve vstrebané. Naviazanie toxínov na povrch kvasinkových buniek je prvým stupňom v detoxikačnom procese. Nasleduje druhý krok pri procese odbúravania toxínov, ktorý je uvádzaný v literatúre pre kvasinkové bunky tiež ako neutralizácia bunkových jedov a cudzorodých látok a je dôvodom, prečo sú kvasinky využívané tiež ako liečebná látka pre ľudí, najmä pri kožných ochoreniach. Prídavok týchto kvasiniek do krmív je vhodný práve preto, že eliminuje pôvodcov zažívacích ochorení a ich toxíny a zároveň viaže a detoxikuje mykotoxíny. Kvasinky, či už samostatné alebo v kombinácii s inými účinnými látkami, dávajú spravidla lepšie výsledky ako iné doplnkové látky (Kulovaná, 2001).

Polyméry kvasinkových buniek, ktoré tvoria nosnú štruktúru bunky pochádzajú u kultúrnych kvasiniek druhu *Saccharomyces cerevisiae* z glukózových a mannózových monomérov pospájaných glykozidickými väzbami, v ktorých sú v jednom rade uložené slučky biologicky aktívnych substancií a sú nimi spevnené bunkové steny. Táto sieť má vďaka svojej štruktúre veľkú povrchovú plochu, takže presahuje u kvasinkovej bunky väzobnú kapacitu ílovitých minerálov (napr. bentonity alebo zeolity sa používajú ako prídavky do krmiva k detoxikácii mykotoxínov). Zatiaľ čo väzba mykotoxínov na glukomannany za 10 minút dosiahne stupeň nasýtenia, u ílov to trvá 72 hodín. Okrem toho, aby sa dosiahol zodpovedajúci účinok, treba namiesto 0,5 kg kvasiniek použiť až 4 kg bentonitu. Pri dávke 500 g.t⁻¹ krmiva ide o povrch kvasiniek, ktorý zodpovedá viac než hektárovej ploche s väzobnou schopnosťou. Táto skutočnosť ukazuje na to, aký veľký detoxikačný potenciál sa v kvasinkách ukrýva.

Saccharomyces cerevisiae nastoľujú, vďaka naviazaniu bakteriálnych pôvodcov zažívacích ochorení a ich toxínov, rovnováhu v čreve, okrem toho regulujú transport chloridu sodného - zabránením prívodu vody do čreva zastavujú hnačku a následne upravujú konzistenciu výkalov. Eliminujú substanciu, ktorá poškodzuje črevný epitel (Kulovaná, 2001).

1.8.8 Využitie kvasiniek na výrobu beta-glukánu

So svetovou produkciou 1575 miliónov hektolitrov piva za rok sa nahromadí 31,500 – 47,250 miliónov hektolitrov odpadu kvasiniek každý rok. Väčšina z týchto kvasiniek sa predáva ako krmivo za nízke ceny (Jaehrig et al., 2008). Bunkové steny kvasiniek sú však ideálnou surovinou na výrobu β -1,3-D-glukánu, keďže sú lacné a majú dostatočne vysoký obsah glukánu (Freimund et al., 2003). Tento štruktúrny polymér bunkovej steny má biologickú aktivitu a potenciálnu fyziologickú aktivitu. Z tohto dôvodu by výroba vysoko-výživného produktu, napr. funkčného jedla z kvasiniek, mohla priniesť pivovarom a droždiarskemu priemyslu dodatočné príjmy a eliminovať náklady na likvidáciu odpadu (Jaehrig et al., 2008).

Prvý produkt obohatený glukánom pripravený z pekárskej kvasinky sa nazval zymosan. Zymosan mal zdraviu prospešné vlastnosti a obsahoval približne 55% β -D-glukánu, 19% mannánov, 15% proteínov a 7% lipidov (Freimund et al., 2003).

1.9 Beta-glukán – všeobecná charakteristika

Prvé bližšie znalosti o beta-glukánoch pochádzajú zo šesťdesiatych rokov minulého storočia, kedy sa výskumu venovala predovšetkým skupina vedcov z New Orleansu (Větvička, 2008).

Vlastná história polysacharidov ako imunomodulátorov však siaha do štyridsiatich rokov minulého storočia, kedy Shear so spolupracovníkmi popísal látku z kultúry *Serratia marcescens*, ktorá spôsobovala nekrózu tumorov. Neskôr bola táto látka (Shearov polysacharid) identifikovaná ako zmes troch polysacharidov, obsahujúcich hlavný reťazec z D-glukózových a D-mannózových zvyškov viazaných (1→3) glykozidovými väzbami. Postupne boli hľadané ďalšie imunomodulátory pochádzajúce z rôznych zdrojov a tak sa objavili na scéne beta-glukány (Novák, 2007). V histórii beta-glukánov možno následne vystopovať dve línie vychádzajúce z odlišných východísk, ale postupne konvergujúce: prvá prebiehala predovšetkým v USA a tiež v Európe, druhá v Ázii, predovšetkým v Japonsku.

Výskum beta-glukánov v euro-americkom prostredí vychádzal z poznatkov o imunomodulačných účinkoch zymosanu (Novák, 2007). Zymosan bol po prvýkrát popísaný v roku 1941 potom, čo Pillemer a Echer zistili, že účinnou zložkou kvasinky je nerozpustná frakcia bunkovej steny, ktorú nazvali zymosan (Young; Castranova, 2005). Zymosan je teda časť získaná z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* zložená z množstva rozličných látok: mannánov, glukánov, chitínu, glukózamínu a glykoproteínov (Akramienė et al., 2007). Využívaný bol pri určovaní alternatívnej dráhy aktivácie komplementu, pričom neskoršie štúdie ukázali, že priama intravenózna injekcia zymosanu môže aktivovať imunitný systém stimuláciou obrannej reakcie organizmu. Hoci bol zložený z mnohých zložiek, práve beta-glukány boli určené ako biologicky aktívna súčasť (Brown; Gordon, 2003). Pionierske práce v tomto smere uskutočnil Nicholas R. DiLuzio z Tulance University v New Orleansu v 60. rokoch, ktorý izoloval beta-glukán zo zymosanu a skúmal jeho imunomodulačné účinky (Novák, 2007). Mechanizmus pôsobenia tejto látky pri stimulácii imunitného systému popísal ako prvý v roku 1980 Dr. Joyce Czop z Harvardskej univerzity (Levesque, 2009).

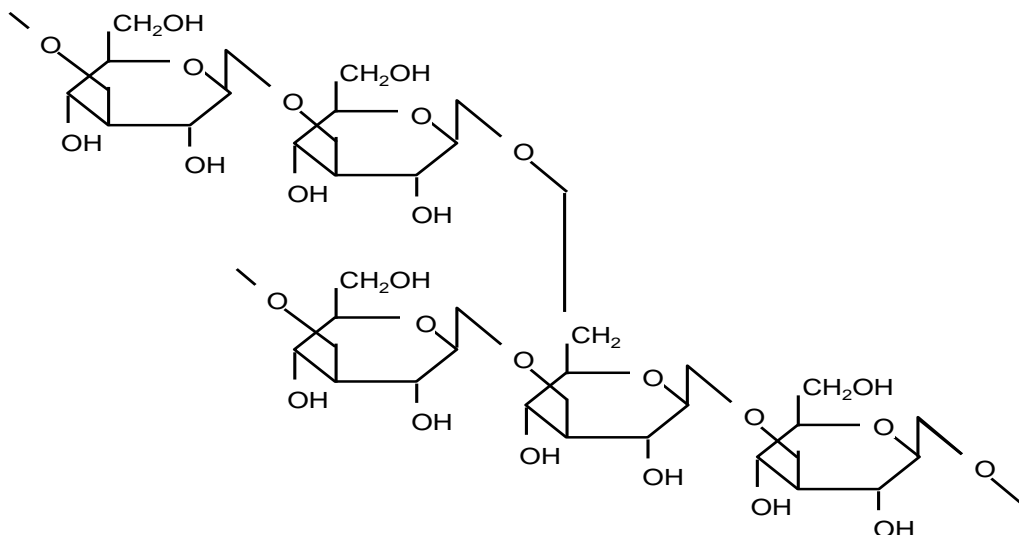
Ako už bolo pred rokmi zistené, β -D-glukány sa nachádzajú jednak v bunkových stenách vyšších rastlín a vo väčšom množstve v semenách niektorých obilnín ako napr. ovse a jačmeni. Veľmi príbuzné, avšak biologicky oveľa účinnejšie, sú β -D-glukány

nachádzajúce sa v bunkových stenách vyšších húb, vláknitých húb a kvasiniek (Maršálek; Hrnčíř, 2000).

1.10 Chemické zloženie, štruktúra a rozpustnosť β -D-glukánu

Z chemického hľadiska sú látky, ktoré súhrnne nazývame β -D-glukány, tzv. neškrobové a necelulózoové polysacharidy, patriace medzi hemicelulózy (Maršálek; Hrnčíř, 2000). Sú to polysacharidy, s dlhým reťazcom, kde jediným štruktúrnym komponentom je glukóza (Chovancová; Šturdík, 2005). Základný rozdiel medzi škrobom, resp. medzi jeho zložkami, amyložou a amylopektínom, ďalej celulózou a β -D-glukánom je v tom, že molekuly amyložy sa skladajú z molekúl glukózy spojených väzbami α -1,4- (u celulózy väzbami β -1,4-) na rozdiel od β -D-glukánov, kde sú molekuly glukózy spojené väzbami β -1,3-. Polysacharidy nazývané β -D-glukány so zmiešanými väzbami β -1,3- a β -1,4- sú v prírode súčasťou bunkových stien vyšších rastlín, kde vyplňajú priestory medzi celulózoovými vláknami a vo väčšom množstve v semenách niektorých obilnín. Ako sme už spomínali, biologicky účinnejšie sú polyméry s väzbami β -1,3- a β -1,6-, ktoré sa nachádzajú v hubách a v kvasinkách. Jednotlivé β -1,3-D-glukány sa následne od seba odlišujú molekulovou hmotnosťou, ďalej postranným vetvením molekuly pomocou väzby β -1,6-, stupňom substitúcie hlavného reťazca a počtom glukózových jednotiek v postranných reťazcoch (Maršálek; Hrnčíř, 2000). Najaktívnejšou formou beta-1,3-D-glukánov sú teda tie, ktoré obsahujú postranné reťazce v pozíciách 1,6 a rozvetvujú sa z dlhšieho beta-1,3-glukánového reťazca. Z tohto dôvodu sa v niektorých literárnych zdrojoch uvádza beta-1,3-glukán aj ako beta-1,3/1,6-glukán (Chovancová; Šturdík, 2005).

Štúdie *in vitro* a *in vivo* odhalili, že imunomodulačné vlastnosti β -D-glukánu súvisia práve zo spomínanou štruktúrou, ale tiež jeho molekulovou hmotnosťou a postrannými reťazcami (Magnani et al., 2009). Napríklad Brown a Gordon zistili, že β -D-glukány z húb s vysokou molekulovou hmotnosťou častíc priamo aktivujú leukocyty, zatiaľ čo β -D-glukány z húb s nízkou molekulovou hmotnosťou iba upravujú odpoveď bunky stimuláciou napr. cytokíny (Volman; Ramakers; Plat, 2008).



Obr. 4: Jednoduchá molekulárna štruktúra beta-glukánu (*Apiglukan = betaglukan a včelí med, ideální kombinace pro zdraví*, [cit. 2010.02.23]).

Podľa rozpustnosti možno ďalej β -D-glukány rozdeliť do dvoch veľkých skupín:

- A. β -D-glukány tvoriace vo vode gél (rozpustné), ktoré možno ešte ďalej rozdeliť na:
 - a.) vysokomolekulárne, vetvené β -D-glukány (napr. grifolan, schizophyllan, scleroglucan)
 - b.) lineárne β -D-glukány (napr. laminaran z hnedých morských rias)
 - c.) chemicky modifikované β -D-glukány (napr. karboxymetylované, sulfonované alebo fosforylované β -D-glukány).
- B. Partikulárne (nerozpustné) β -D-glukány (napr. kvasničný glukán).

β -D-glukány prvej skupiny sú okrem toho obvykle kompletne rozpustné v alkáliách. V súčasnosti bol vyslovený predpoklad, že (aspoň u niektorých β -D-glukánov) rozpustnosť alebo nerozpustnosť v alkáliách je daná iba rozsahom, v akom sú previazané s chitínom (Novák, 2007).

1.11 Beta-glukán v kvasinkách

Beta-glukán je hlavným komponentom v bunkovej stene kvasiniek a na rozdiel od chitínu je rovnomerne rozložený okolo bunky. Ide o všeobecné pomenovanie označujúce komplexnú štruktúru pozostávajúcu zo skupiny polysacharidov, kde hlavným štruktúrnym komponentom je veľký lineárny β -1,3-glukán vetvený v polohe β -1,6-. Okrem neho je tam

prítomný menší, veľmi rozvetvený komponent β -1,6-glukán s postrannými reťazcami v polohe β -1,3- a β -1,6- (Cid et al., 1995).

1.11.1 β -1,3-glukán

β -1,3-glukán formuje mikrofibrilárnu kostru cez ktorú sú naviazané ostatné zložky. Je zodpovedný za mechanickú pevnosť steny a najčastejšie sa farbí anilínom. β -1,3-glukán patrí do tzv. „rodiny dutej závitnice“, inými slovami má tvar porovnateľný s pružinou, ktorá môže existovať v rôznych stavoch predĺženia. V bunkách zo stacionárnej fázy rastu β -1,3-glukán obsahuje okolo 1500 glukózových jednotiek a je vo vode nerozpustný. Určenie stupňa polymerizácie závisí do veľkej miery od typu kyseliny použitej na jeho extrakciu. Všeobecne sa stupeň polymerizácie mení od podmienok prostredia, od rastovej fázy a zdroja uhlíka. V stacionárnej fáze rastu bunky je β -1,3-glukán mierne rozvetvený a obsahuje okolo 3-4% β -1,6- viazaných glukózových zvyškov. Aj počet vetvených β -1,6-glukánových zvyškov závisí od rastových podmienok (Mazáň; Mazáňová; Farkaš, 2006).

1.11.2 β -1,6-glukán

β -1,6-glukán je značne vetvený, vo vode rozpustný polymér, ktorý obsahuje priemerne okolo 130–150 glukózových jednotiek. Nie je známe, či β -1,6-glukán je syntetizovaný ako vo vode nerozpustný polymér, podobne ako β -1,3-glukán, alebo vo vode rozpustná vetvená molekula β -1,3-/ β -1,6-glukánu ako u *Sclerotium rolfsii*. Považuje sa za kľúčový komponent, pretože navzájom viaže ostatné zložky bunkovej steny. V stresových podmienkach výstavby bunkovej steny, kedy prebieha zvýšená syntéza chitínu, slúži ako akceptorové miesto pre novo vznikajúci chitín (Kollár et al., 1997). Bolo objavených niekoľko génov, ktoré ovplyvňujú hladinu β -1,6-glukánu (Shahinian; Bussey, 2000). Rôzne proteíny lokalizované v endoplazmatickom retikule, Golgiho aparáte a na povrchu steny silne ovplyvňujú obsah β -1,6-glukánu v bunkovej stene (Mazáň; Mazáňová; Farkaš, 2006).

1.12 Mechanizmus účinku beta-glukánov

O imunoaktívnom pôsobení beta-glukánov existuje v súčasnej literatúre viac ako 1500 často veľmi kvalitných publikácií, pričom najmä posledné desaťročie pomohlo odhaliť otázku ako vlastne beta-glukány fungujú. Stimulačné účinky najrôznejších beta-glukánov boli popísané už u evolučne primitívnych *Arthropoda*, kde sa jedná o aktiváciu zrážacích kaskád pri koagulácii. Prostredníctvom proteolytického štiepenia serínovými proteinázami vzniká gélovitá zrazenina, ktorá zabraňuje ďalšiemu pohybu invadujúcich mikroorganizmov. Principiálne odlišný, ale podobne účinný efekt beta-glukánu bol preukázaný u kôrovcov, kde proteín, ktorý viaže glukán aktivuje fenoxidázu. Ďalšie štúdie preukázali stimuláciu imunitných reakcií u dážd'oviek, rýb, kurčiat, myší, morčiat, prasiat, oviec, koní a kráv, takže je beta-glukán považovaný za jednu z mála látok, ktoré sú účinné v celom spektre živočíšnych druhov. Niektoré práce dokonca dokazujú aj aktiváciu obranných mechanizmov rastlín (Větvička, 2004).

Hlavné imunofarmakologické aktivity beta-glukánov zahŕňajú zvýšenú rezistenciu hostiteľa voči vírusovým, bakteriálnym, fungálnym a parazitárnym infekciám, protinádorový efekt, prevenciu karcinogenézy a rádioprotektívne účinky (Novák, 2007). Tiež majú silné antioxidačné vlastnosti a zachytávajú voľné radikály. Okrem toho zvyšujú efektívnosť antibiotík a redukujú hladinu LDL cholesterolu v tele (Kim; Yun, 2006). Kvasinkový beta-glukán je tiež schopný adsorbovať mykotoxíny (zearalenon, aflatoxín B₁, deoxynivalenol, ochratoxín A, patulín), pravdepodobne prostredníctvom vodíkových mostíkov a Van der Waalsových síl, pričom tento efekt beta-glukánov je významný najmä u hospodárskych zvierat. V poslednej dobe sa preukázalo, že beta-glukán môže mať významný efekt pri profylaxii následkom použitia biologických zbraní – predovšetkým nákazy anthraxom. Je tiež známe, že obilniny, huby a kvasinky podporujú črevnú motilitu a môžu byť využité k zlepšeniu intestinálnych problémov. Nestráviteľné beta-glukány predstavujúce významnú zložku týchto látok môžu tiež modulovať mukosálnu imunitu črevného traktu. Okrem toho v centrálnom nervovom systéme beta-glukány aktivujú mikrogliové bunky, ktoré hrajú významnú úlohu pri ochrane pred ochoreniami typu Alzheimerovej choroby alebo AIDS (Novák, 2007).

Možné účinky beta-glukánov v makroorganizme sú teda veľmi rozmanité a zasahujú nielen imunitný systém, pravdepodobne je však väčšina popísaných účinkov určitým spôsobom viac či menej spojená s funkciou imunitného systému. Najvýraznejšie

sa účinok beta-glukánov prejavuje zvýšením fagocytárnej a proliferačnej aktivity fagocytov. Medzi tieto bunky zaradujeme neutrofilné granulocyty, monocyty, makrofágy a dendritické bunky. V prejavoch biologickej aktivity beta-glukánov sa najviac uplatňujú makrofágy, ktoré sú považované za základné výkonné bunky v obrane hostiteľa voči baktériám, prvokom, vírusom, viacbunkovým parazitom, nádorovým bunkám a chybným vlastným bunkovým klonom (Novák, 2007).

Biologické účinky beta-glukánov sa teda prejavujú na rôznych úrovniach, pričom ich hlavná úloha spočíva v aktivácii imunitných buniek - makrofágov. Glukány sú rozpoznávané leukocytmi pomocou špecifických receptorov. V závislosti od toho, ktorý receptor je zapojený, leukocyt reaguje. Obyčajne ide o receptory, ktoré rozlišujú jednotlivé sacharidové jednotky. Spojením makrofága s beta-1,3-D-glukánom sa makrofág aktivuje. Aktivácia predstavuje nasledujúce deje:

- zvýšenie fagocytujúcej aktivity makrofágov
- uvoľnenie primárnych a sekundárnych cytokínov (IL-, IL-2, IL-6,...)
- uvoľnenie interferónov
- aktivácia buniek špecifického imunitného systému (T a B bunky)

Aktivované makrofágy sa spolu s ďalšími uvoľnenými cytokínmi podieľajú na nešpecifickej imunite: každý z receptorov navodí inú činnosť fagocytov.

Úlohou makrofágov je pohltiť cudzorodé objekty (baktérie, vírusy) a mobilizovať imunitný systém, rozpoznávať a ničiť poškodené bunky (napr. rakovinové).

Veľa receptorov zodpovedá za rozpoznanie a väzbu cudzorodých štruktúr, akými sú mikróby a vírusy. Buď tieto štruktúry na seba naviažu, alebo do nich vpraví rozpoznávacíe zlúčeniny, tzv. opsoníny. Ako už bolo povedané, fagocyty a NK-bunky (natural killers-prirodzené zabíjače) majú receptory rozpoznávajúce glukány. Najvyššiu imunostimuláciu vykazujú glukány s vyšším počtom väzbových miest - postranných reťazcov. Glukány pôsobia tak na leukocyty (makrofágy) ako i lymfocyty (NK-bunky).

Leukocyty (monocyty, makrofágy) a NK-bunky majú povrchové receptory špecificky rozpoznávajúce jednotlivé glukány v závislosti od ich koncentrácie a štruktúry. Akonáhle sa stretne makromolekula glukánu so skupinou glukánových receptorov, bunka je aktivovaná a vytvára bakteriocídne zložky ako lyzozým, reaktívne kyslíkové radikály a oxidy dusíka. Ďalej bunky začnú vytvárať niekoľko cytokínov, ktoré aktivujú fagocyty a leukocyty zodpovedajúce za tvorbu získanej (špecifickej) imunity. Takže glukány indukujú

nielen lokálnu aktiváciu buniek, ale aj systematickú reakciu organizmu, pretože cytokíny sú produkované bunkami migrujúcimi z miesta na miesto (Chovancová; Šturdík, 2005).

1.13 Nežiaduce účinky beta-glukánov

Prevažujúci imunofarmakologický účinok beta-glukánov je pozitívny, avšak nemožno prehliadnuť ani určité nepriaznivé vedľajšie účinky, ktoré tieto látky majú. V súčasnej dobe je popísaných pomerne málo nežiaducich efektov beta-glukánov, avšak možno predpokladať, že s postupujúcim prehĺbovaním znalostí o širokospektrálnych účinkoch týchto látok sa táto oblasť bude rozširovať.

Intramuskulárne podávaný partikulárny beta-glukán spôsobuje v mieste vpichu zápalovú reakciu a tvorbu granulómov, predovšetkým je však tento spôsob aplikácie značne bolestivý (Novák, 2007). Samotný fakt, že beta-glukán je príčinou vzniku zápalovej reakcie so sebou prináša určité nebezpečenstvo. Fyziologický zápal prebieha v rozsahu a tempe odpovedajúcom vyvolávajúcej škodlivine, teda prítomnosti beta-glukánu. Pokiaľ však pôsobenie škodliviny pretrváva – a to vzhľadom k obtiažnej odbúrateľnosti beta-glukánu je možné – môže dôjsť k patologickému zápalu s nadmerným tkanivovým poškodením, s prechodom do chronicity, poruchami imunoregulácie a rozvojom imunopatologického (napr. autoimunitného) procesu. Najväznejšiu hrozbu predstavuje generalizácia zápalových dejov s rozvojom šoku a fatálnym multiorgánovým zlyhaním (MODS – multiple organ dysfunction syndrome), takýto prípad bol popísaný u zymosanu (Tanriverdi et al., 2005).

Inhalácia intaktných buniek alebo bunkového detritu vláknitých húb alebo kvasiniek, ktoré sú súčasťou domáceho prachu (Beijer; Thorn; Rylander, 2002) alebo rôznych poľnohospodárskych a priemyslových prachov (Rylander; Thorn; Attefors, 1999), spôsobuje tzv. syndróm toxického organického prachu (TODS), ktorý je charakterizovaný pľúcnymi reakciami, vrátane zápalu pľúc, kašľa a chronickej bronchitídy (Sato et al., 2003), ďalej bolesťami hlavy, dráždením očí a krku (Alwis; Mandryk; Hocking, 1999). Vzhľadom k tomu, že aplikácia beta-glukánov v ľudskom tele vyvoláva zápalové procesy možno predpokladať, že môže dôjsť ku kompetitívnej interakcii s protizápalovými liekmi (Yoshioka et al., 1998).

2 Cieľ práce

Cieľom záverečnej diplomovej práce bolo:

- enzymatickou metódou stanoviť obsah celkového glukánu a α -glukánu v troch kmeňoch kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*: 612, Kolín a Gyöng
- zistiť obsah beta-glukánov v jednotlivých kmeňoch kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* a určiť závislosť tohto obsahu od koncentrácie glukózy prítomnej v živnom médiu počas kultivácie daných mikroorganizmov.

3 Metodika práce a metódy skúmania

3.1 Výber vhodného produkčného kmeňa

Pri práci sme využívali tri rôzne kmene *Saccharomyces cerevisiae*: 612, Kolín a Gyöng, ktoré Katedra biochémie a biotechnológie FBP SPU v Nitre získala počas spolupráce so Slovenskými liehovarmi a likérkami, a.s., Leopoldov. Z každého kmeňa sme použili po 6 vzoriek.

3.2 Podmienky kultivácie

Submerznú kultiváciu daných mikrobiálnych kultúr sme uskutočnili na základnom YPD (Yeast Peptone Dextrose) médiu s nasledovným zložením:

- 10 g.dm⁻³ kvasničného autolyzátu
- 20 g.dm⁻³ peptónu pre bakteriologiu
- 20 g.dm⁻³ glukózy

Základné živné médium sme postupne optimalizovali zmenou koncentrácie glukózy v rozmedzí 20 g.dm⁻³ až 45 g.dm⁻³. Cieľom optimalizácie bolo získanie maximálneho výťažku kvasničnej biomasy. Kultiváciu sme realizovali za aeróbných podmienok v bankách na trepačke s 280 ot.min⁻¹ pri teplote 30 °C, počas 48 hodín.

Mikrobiálnu biomasu sme od živného média oddelili centrifugáciou na laboratórnej odstredivke (T 62.2, SRN). Pre získanie čistej biomasy je potrebné opakované premývanie živnej pôdy destilovanou vodou a opätovná centrifugácia. V získaných bunkách kvasiniek sme po zlyofilizovaní (LYOVAC GT 2, Nemecko) stanovovali množstvo beta-glukánu.

3.3 Stanovenie β -1,3/1,6-glukánu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*

Stanovenie glukánov v kvasinkách sme uskutočnili pomocou testu „Mushroom and Yeast Beta-glucan“ (fy Megazyme, Írsko).

Princíp stanovenia:

1,3/1,6- β -D-glukán, 1,3- β -D-glukán, a α -glukány sú rozpustené v koncentrovanej (37 %, 10 mol.dm⁻³) HCl a potom hydrolyzované s 1,3 mol.dm⁻³ HCl 2 hodiny pri 100 °C. Hydrolýza na D-glukózy je ukončená inkubáciou so zmesou vysoko purifikovaných enzýmov – exo-1,3- β -glukanázou a β -glukozidázou. Kým niektoré β -glukány sú rozpustné v horúcej vode alebo v horúcom KOH, tieto rozpúšťadlá nie sú účinné, čo sa týka rozpustnosti β -glukánov z kvasiniek alebo vláknitých húb. Analýzy týchto glukánov vyžadujú najprv čiastočnú kyslú hydrolýzu za účelom odstránenia gél-tvoriacich vlastností a kovalentných väzieb s inými polysacharidmi (napr. chitín) alebo bielkovinami.

Pre stanovenie β -1,3/1,6-glukánu je potrebné najskôr zmerať celkový glukán, následne zmerať α -glukán a pomocou výpočtov stanoviť β -1,3/1,6-glukán.

3.3.1 Meranie celkového glukánu

Vzorky kvasiniek sme si najskôr pomleli tak, aby prešli cez 0,5 mm sito. Následne sme prešli k meraniu celkového glukánu, ktoré pozostáva z dvoch krokov: rozpustenia a čiastočnej hydrolýzy celkového glukánu a samotného merania.

A. Rozpustenie a čiastočná hydrolýza celkového glukánu (α -glukán+ β -glukán)

V prvom kroku sme si do skúmavky navážili 100 mg pomletej vzorky, tak aby sa celá vzorka nachádzala na dne skúmavky. Do skúmavky sme následne pridali 1,5 cm³ konc. HCl (37%), skúmavku sme uzavreli a miešali na vortexovom mixéri. Po premiešaní sme skúmavku vložili do vodného kúpeľa vytemperovaného na 30 °C, kde sme ju nechali po dobu 45 min. (kým sa nedosiahla úplná degradácia β -glukánu). Po túto dobu sme každých 15 min. obsah skúmavky premiešali na vortexe. Po uplynutí 45 min. sme do skúmavky pridali 10 cm³ vody, skúmavku sme uzavreli a jej obsah znovu premiešali na vortexe. Skúmavky s uvoľnenými uzávermi sme vložili do vriaceho vodného kúpeľa, ktorý sme vytemperovali na 100 °C. Po 5 min. sme uzávěry utiahli a pokračovali sme v inkubácii po dobu 2 hodín.

Po dvoch hodinách sme skúmavky ochladili pri izbovej teplote, opatrne sme uvoľnili zátky a pridali 10 cm^3 (2 mol.dm^{-3}) KOH. Obsah každej skúmavky sme následne kvantitatívne preniesli do 100 cm^3 odmernej banky, skúmavky sme dôkladne vymyli octanovým tlmivým roztokom pH 5,0, s ktorým sme tiež doplnili objem v odmernej banke po rysku. Obsah v banke sme dôkladne premiešali prevrátením banky a alikvótnu časť obsahu banky sme centrifugovali 10 min. pri 3000 ot.min^{-1} .

B. Meranie celkového glukánu

Po centrifugácii sme preniesli $0,1 \text{ cm}^3$ odstredeného extraktu na dno sklenenej skúmavky a pridali sme $0,1 \text{ cm}^3$ zmesi enzýmov exo-1,3- β -glukanázy a β -glukozidázy v octanovom tlmivom roztoku pH 5,0. Obsah skúmavky sme premiešali na vortexe a následne sme skúmavky inkubovali vo vodnom kúpeli pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 60 min. Po uplynutí tejto doby sme do skúmavky pridali $3,0 \text{ cm}^3$ zmesi glukózaoxidáza/peroxidáza (GOPOD) a inkubovali sme ju vo vodnom kúpeli pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 min. Nakoniec sme zmerali absorbanicu vzorky pri 510 nm oproti blanku.

3.3.2 Meranie α -glukánu

Do skúmavky sme si navážili 100 mg pomletej vzorky tak, aby sa celá vzorka nachádzala na dne skúmavky. Pridali sme magnetickú miešaciu tyčinku, 2 cm^3 (2 mol.dm^{-3}) KOH a suspendovali sme čiastočky tak, aby sa rozpustil fytoglykogén/škrob miešaním 20 min. v ľadovom vodnom kúpeli nachádzajúcom sa na magnetickom miešadle.

Následne sme do skúmavky za stáleho miešania pridali 8 cm^3 octanového tlmivého roztoku pH 3,8 a $0,2 \text{ cm}^3$ roztoku zmesi amyloglukozidáza/invertáza. Skúmavky s dobre premiešaným obsahom sme vložili do vodného kúpeľa vyhriateho na $40 \text{ }^\circ\text{C}$, kde sme skúmavky inkubovali po dobu 30 min. za ich občasného premiešania na vortexe. Po inkubácii sme zmerali objem vzorky pomocou odmerného valca, pričom výsledný objem sme zohľadnili pri výpočtoch.

Alikvótnu časť vzorky sme následne centrifugovali pri 3000 ot.min^{-1} po dobu 10 min. Po skončení centrifugácie sme vzorku prefiltrovali a preniesli $0,1 \text{ cm}^3$ supernatantu do sklenenej skúmavky. Pridali sme $0,1 \text{ cm}^3$ octanového tlmivého roztoku pH 5,0 a $3,0 \text{ cm}^3$

GOPOD reagentu a vzorku sme inkubovali pri 40 °C 20 min. Nakoniec sme zmerali absorbanciu roztoku pri 510 nm oproti blanku.

Pri každom stanovení sme si navyše pripravili ešte reagenčný blank a glukózový štandard. Reagenčný blank sme pripravili tak, že do skúmavky sme napipetovali 0,2 cm³ octanového tlmivého roztoku pH 5,0 a 3,0 cm³ reakčnej zmesi enzýmov glukózaoxidáza/peroxidáza (GOPOD). Pri príprave glukózového štandardu sme do skúmavky napipetovali 0,1 cm³ štandardu D-glukózy a 0,1 cm³ octanového tlmivého roztoku pH 5,0 a 3,0 cm³ reakčnej zmesi enzýmov GOPOD. Následne sme glukózový štandard inkubovali pri 40 °C po dobu 20 min.

3.3.3 Výpočet β-glukánu

A. Výpočet celkového glukánu (% w/w):

$$\text{Celk. glukán} = \Delta E \times F \times 100/0,1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180$$

$$\text{Celk. glukán} = \Delta E \times F/W \times 90$$

B. Výpočet α-glukánu (% w/w):

$$\alpha\text{-glukán} = \Delta E \times F \times 100 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180$$

C. Výpočet β-glukánu (% w/w):

$$\beta\text{-glukán} = \text{celkový glukán} - \alpha\text{-glukán}$$

Vysvetlivky:

ΔE = absorbancia vzorky – absorbancia blanku

F = faktor premeny absorbancie na μg D-glukózy

$$= \frac{100 (\mu\text{g štandardu D-glukózy})}{\text{absorbancia GOPODU pre } 100 \mu\text{g štandardu D-glukózy}}$$

W = hmotnosť analyzovanej vzorky

$100/W$ = prepočet na 100 mg vzorky

$1/1000$ = prepočet z mikrogramov na miligramy

$162/180$ = faktor premeny voľnej D – glukózy na anhydroglukózu, ktorá sa nachádza v β -glukáne

$100/0,1$ = faktor korekcie objemu pre celkový glukán (bolo analyzovaných $0,1 \text{ cm}^3$ z celkových 100 cm^3)

100 = faktor korekcie objemu pre α -glukán

4 Výsledky a diskusia

β -D-glukány patria do skupiny prirodzených, fyziologicky aktívnych zlúčenín, všeobecne nazvanej biologické modifikátory odpovede. Predstavujú vysoko zachované štruktúrne komponenty bunkovej steny kvasiniek, vláknitých a vyšších húb, rias a obilnín (Novák; Větvička, 2009).

Výskum zameraný na beta-glukán z kvasiniek je rozmanitejší a omnoho podrobnejší než výskum beta-glukánu z ostatných zdrojov (*Yeast betaglucan*, 2005). Tento polysacharid z kvasiniek sa dá lepšie izolovať a preto sa lepšie vstrebáva do organizmu (*Efektívny a účinný nástroj na posilnenie imunity*, 2011). Beta-1,3-glukány môžu byť izolované skoro z každého druhu kvasiniek, avšak najštudovanejší (Blaylock, 2002) a najefektívnejší je práve beta-glukán z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Větvička et al., 2002). Medzi ďalšie druhy kvasiniek, ktoré môžu byť užitočným zdrojom beta-glukánov patria *Kluyveromyces fragilis* a druhy rodu *Candida*, napr. *Candida utilis* (Wheatcroft et al., 2002).

Dallies, Francois, Paquet (1998) zistili, že bunková stena kvasiniek predstavuje 20-30% bunkovej sušiny. Je tvorená hlavne mannoproteínmi a beta-glukánmi (85-90% sušiny bunkovej steny), menšieho množstva chitínu (1-3%) a lipidov (2-5%). Pomer týchto zložiek sa môže líšiť v závislosti od druhu kvasiniek a podmienok kultivácie. Chemická štruktúra je rozhodujúca najmä pre imunomodulačnú aktivitu beta-glukánov. Určiť presný obsah aktívneho β -1,3/1,6-glukánu vo vzorke môže byť dosť zložitá a veľmi vyčerpávajúca úloha (*Methodology to determine the level of beta-1,3/1,6-glucans*, 2007).

Aquilar-Uscanga a Francois (2003) robili štúdiu, v ktorej zisťovali premenlivosť bunkovej steny s ohľadom na niekoľko rastových podmienok, ako režim kultivácie, povaha uhlíkového zdroja, teplota, pH, aerácia a sledovali ako korelovali zmeny v hodnotách beta-glukánu, mannánu a chitínu s integritou bunkovej steny. Táto ich štúdia bola motivovaná skutočnosťou, že je veľmi málo správ o účinkoch rastových podmienok na kompozíciu bunkovej steny. Keďže kvasinky môžu rásť na rôznych zdrojoch uhlíka (glukóza, mannóza, sacharóza, etanol), možno očakávať napr. zmenu kompozície a štruktúry bunkovej steny indukovanú uhlíkovým režimom. V štyroch nezávislých experimentoch zistili zvýšený pomer beta-1,6-glukánu zo $14 \pm 2,5\%$ v bunkách kultivovaných na glukóze, sacharóze a mannóze a na $21 \pm 3\%$ v bunkách kultivovaných na etanole. Tieto údaje

presvedčivo dokázali, že zloženie polymérov bunkovej steny kvasinky je ovplyvnené povahou uhlíkového zdroja.

V našej práci sme sa zamerali na stanovenie obsahu beta-glukánov v jednotlivých kmeňoch kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* a zistenie závislosti tohto obsahu od koncentrácie glukózy v živnej pôde, keďže beta-glukán je vlastne homopolysacharid pozostávajúci z jednotiek glukózy. Zistili sme, že medzi jednotlivými kmeňmi kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* ako aj medzi jednotlivými vzorkami v rámci jedného kmeňa sú rozdiely v obsahu beta-glukánov. Obsah beta-glukánov pre jednotlivé kmene sme vypočítali z rozdielu stanoveného celkového glukánu a α -glukánu a je uvedený v tabuľkách č. 2, 3 a 4.

Tabuľka č. 2: Stanovenie obsahu beta-glukánov v kmeni 612

Kmeň 612	Celkový glukán, % w/w	α-glukán, % w/w	β-glukán, % w/w
konc. glukózy			
2%	21,63	0,207	19,56
2,5%	19,318	0,134	19,184
3%	18,346	0,183	18,163
3,5%	19,683	0,195	19,488
4%	27,581	0,462	27,119
4,5%	28,188	0,584	27,604

Tabuľka č. 3: Stanovenie obsahu beta-glukánov v kmeni Gyöng

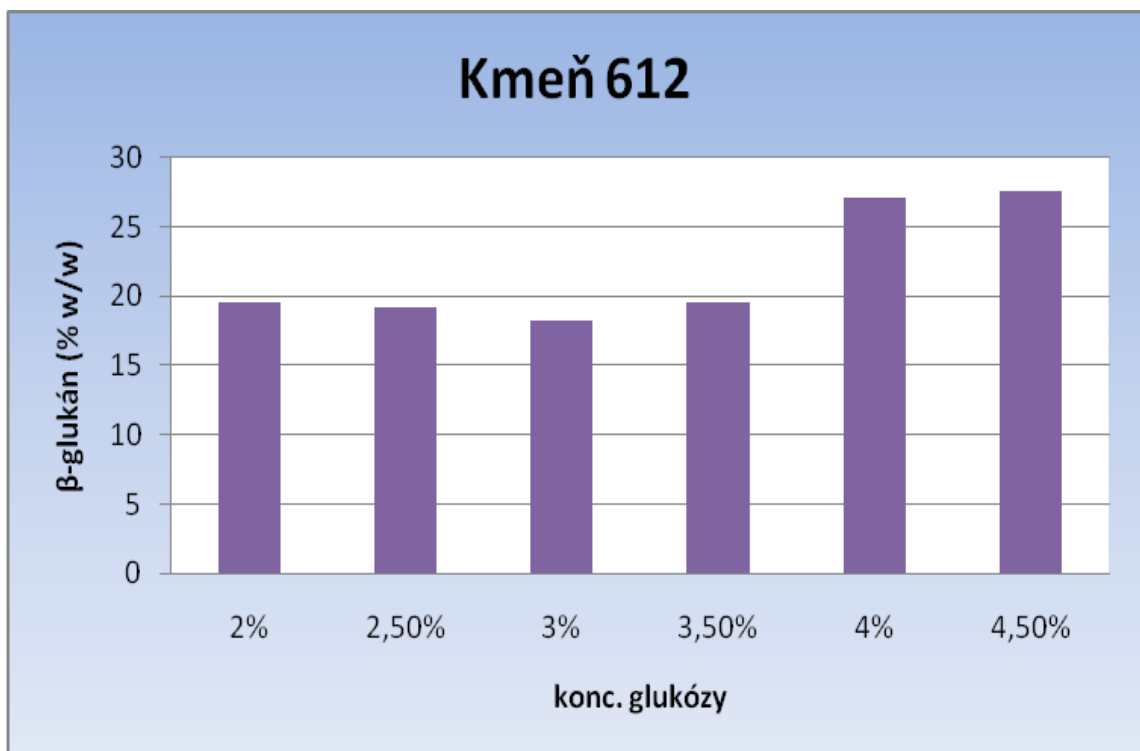
Kmeň Gyöng	Celkový glukán, % w/w	α-glukán, % w/w	β-glukán, % w/w
konc. glukózy			
2%	27,824	0,170	27,654
2,5%	29,798	0,195	29,603
3%	29,889	0,255	29,634
3,5%	21,384	0,304	21,079
4%	29,282	0,389	28,893
4,5%	27,702	0,291	27,410

Tabuľka č. 4: Stanovenie obsahu beta-glukánov v kmeni Kolín

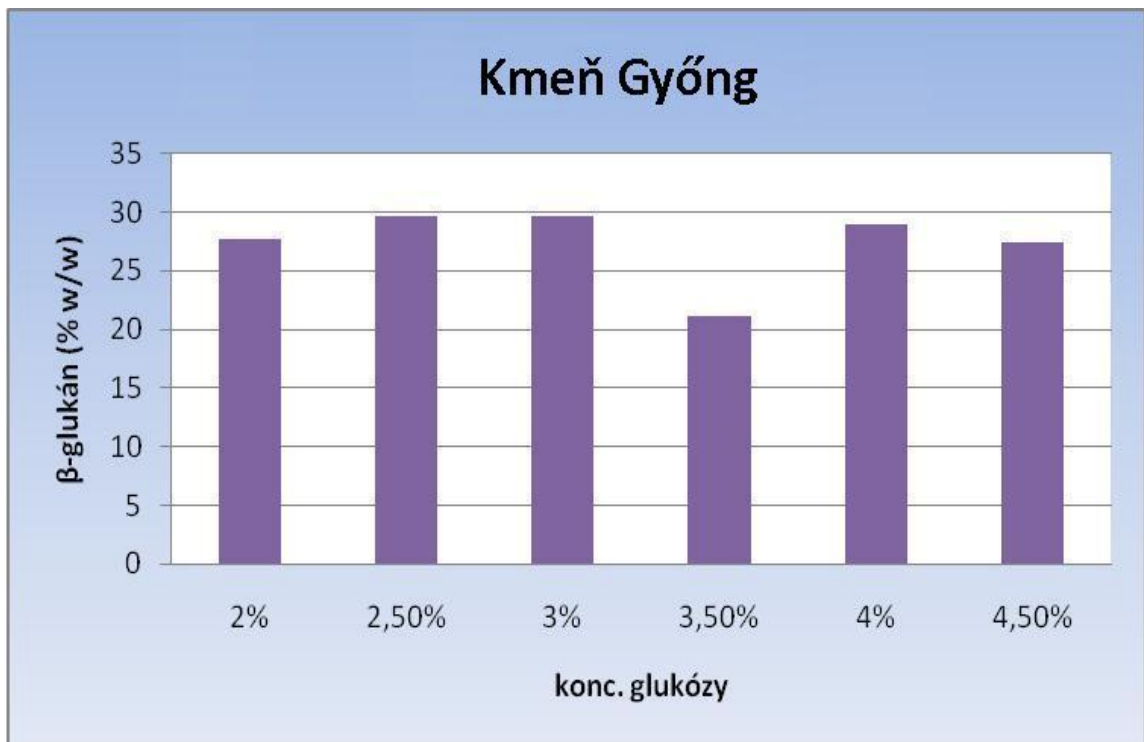
Kmeň Kolín	Celkový glukán, % w/w	α-glukán, % w/w	β-glukán, % w/w
konc. glukózy			
2%	13,486	0,547	12,939
2,5%	20,776	0,462	20,314
3%	20,291	0,486	19,805
3,5%	22,477	0,170	22,307
4%	20,655	0,218	20,437
4,5%	18,468	0,255	18,213

Jednotlivé kmene *Saccharomyces cerevisiae*: 612, Kolín a Gyöng sa líšia zastúpením beta-glukánov v bunkovej stene, aj keď rozdiely nie sú veľmi veľké. Zo sledovaných kmeňov mal najvyšší priemerný obsah beta-glukánov kmeň Gyöng, za ním nasledoval kmeň Kolín a najnižší obsah beta-glukánov mal kmeň 612. Priemerné hodnoty alfa-glukánu vo všetkých hodnotených vzorkách boli veľmi nízke, pohybovali sa v rozmedzí od 0,134 do 0,584 (% w/w).

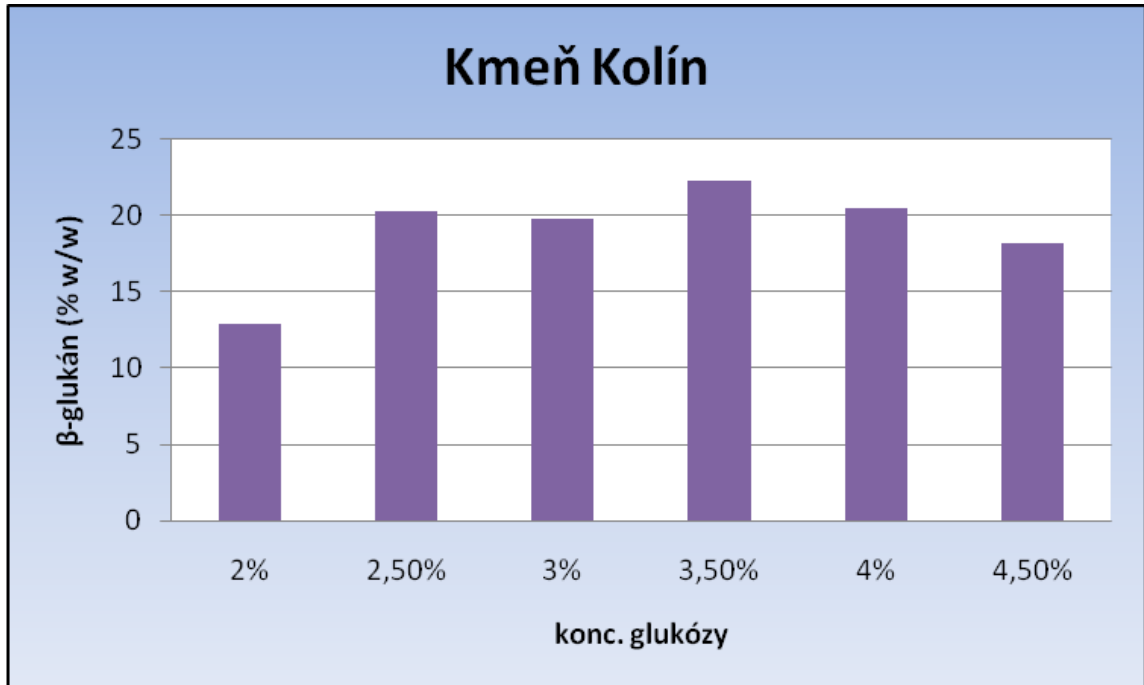
Závislosť obsahu beta-glukánov od koncentrácie glukózy v jednotlivých kmeňoch je znázornená na grafoch 1, 2 a 3.



Graf 1: Závislosť obsahu beta-glukánov od koncentrácie glukózy v živnom médiu v kmeni 612



Graf 2: Závislosť obsahu beta-glukánov od koncentrácie glukózy v živnom médiu v kmeni Gyöng



Graf 3: Závislosť obsahu beta-glukánov od koncentrácie glukózy v živnom médiu v kmeni Kolín

V 18 sledovaných vzorkách kvasiniek sme zistili, že obsah beta-glukánov nie je v korelácii s koncentráciou glukózy v živnom médiu, teda, že jeho obsah sa nezvyšuje rovnomerne so zvyšujúcou sa koncentráciou daného sacharidu v živnej pôde.

V kmeni 612 sa obsah beta-glukánov pohyboval v rozmedzí od 18,163 hmotnostných % pri 3% koncentrácii glukózy v médiu po 27,604% pri 4,5% koncentrácii glukózy v živnej pôde, čo bolo v tomto prípade aj najväčšie množstvo tohto polysacharidu v danom kmeni kvasiniek.

V ďalšom kmeni kvasiniek, s názvom Gyöng, bolo najnižšie hmotnostné % beta-glukánov, a to 21,079, pri kultivácii kvasiniek na živnej pôde s 3,5% obsahom glukózy a približne rovnaké – 29,603 a 29,634% - pri koncentráciách glukózy v médiu 2,5 a 3%.

Posledný kmeň kvasiniek, Kolín, obsahoval vo svojich bunkách najmenšie množstvo sledovaných polysacharidov v porovnaní s predchádzajúcimi dvomi kmeňmi. Najnižší obsah beta-glukánu v rámci daného kmeňa sme zistili vo vzorke kvasiniek kultivovanej na YPD médiu s 2% glukózy a to 12,939%. V danom živnom médiu s 3,5%-nou koncentráciou glukózy sme namerali 22,307 hmotnostných % beta-glukánu, čo predstavovalo jeho najvyššie množstvo v tomto kmeni kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*.

Kontrola kompozície bunkovej steny je významná najmä pre biotechnologický priemysel, pretože sa zväčšuje komerčný záujem o produkciu beta-glukánu, hlavne pre farmaceutické a kozmetické účely (Aquilar-Uscanga; Francois, 2003).

Analýza stavby bunkovej steny je založená na oddelení štruktúrnych komponentov chemickými alebo enzymatickými metódami. Pretože chemické metódy sú hrubé a môžu poškodiť pôvodnú štruktúru polymérov využívajú sa najmä miernejšie enzymatické metódy (Dallies, Francois, Paquet, 1998). Popísaných bolo teda viacero metód, ktorými možno určiť kvantitatívny obsah beta-glukánov. Niektoré boli založené napr. na kyslej hydrolýze nasledovanej determináciou celkového množstva uvoľnenej glukózy. Pri tomto postupe je negatívom, že aj ostatné polyméry glukózy vo vzorke môžu poskytovať uvoľnenú glukózu, čo má za následok nepresné meranie. Ďalšia metóda zahŕňa degradáciu beta-glukánov v dimetylsulfoxide (DMSO) a meranie obsahu beta-glukánov NMR spektroskopiou oproti štandardu. Táto metóda vyžaduje, aby bola vzorka ľahko rozpustná v DMSO a neobsahovala žiadne interferujúce látky (Danielson et al., 2010).

Metóda, ktorú sme využívali aj v našej práci, je metóda enzymatická. Zahŕňa kyslú hydrolýzu beta-glukánov s nasledovaným enzymatickým štiepením glukózy. Na stanovenie daných polysacharidov sme použili komerčne dostupný test firmy Megazyme.

Danielson et al. (2010) uskutočnili modifikáciu tejto enzymatickej metódy a test, ktorý zahŕňa dve enzymatické reakcie premeny beta-glukánov na glukózu, následne meranú kolorimetricky, nazvali „The glucan enzymatic method“ (GEM). Bolo dokázané, že GEM poskytuje správne a presné meranie obsahu beta-glukánov vo vzorkách suchého práškového zloženia izolovaných z kvasiniek. GEM analýza je taktiež schopná správne zmerať obsah beta-glukánov vo vzorkách obsahujúcich aj iné polysacharidy, ako napr. R-1,4-glukány alebo mikrokryštalická celulóza.

V našej práci sme pri analýzach beta-glukánu využívali na určenie glukózy zmes enzýmov glukózoxidázy/peroxidázy (GOPOD), ktorá je podľa Danielsona et al. na stanovenie týchto polysacharidov najvhodnejšia pre jej vysokú citlivosť. Existuje však množstvo ďalších komerčne dostupných enzýmov, ktoré sa dajú použiť na určenie glukózy, napríklad hexokináza (Danielson et al., 2010).

Záver

V danej diplomovej práci sme sa venovali kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*. Hoci existoval predpoklad, že význam tejto kvasinky v budúcnosti poklesne, pretože produkuje iba minimálne množstvo sekundárnych metabolitov, jej význam naopak s pokrokom modernej molekulárnej genetiky úmerne narastá. Mojou prácou som preto chcela poukázať na dôležitosť *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré patria medzi najvýznamnejšie a najčastejšie využívané kvasinky. Majú široký rozsah využitia nielen v potravinárskom priemysle a poľnohospodárstve, ale tiež vo farmaceutickom priemysle, pričom ich význam z priemyselného hľadiska stále narastá. V súčasnosti sú tieto kvasinky využívané aj ako zdroj beta-glukánov, na ktoré sme upriamili našu pozornosť.

Naším cieľom bolo stanovenie glukánov v jednotlivých vzorkách *Saccharomyces cerevisiae* a určenie závislosti tohto obsahu od koncentrácie glukózy prítomnej v živnom médiu počas kultivácie mikroorganizmov. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že v 18 sledovaných vzorkách kvasiniek obsah beta-glukánov nie je v korelácii s koncentráciou glukózy v živnom médiu, to znamená, že jeho obsah sa nezvyšuje rovnomerne so zvyšujúcou sa koncentráciou daného sacharidu v živnej pôde.

V kmeni 612 sa obsah beta-glukánov pohyboval v rozmedzí od 18,163 hmotnostných % pri 3% koncentrácii glukózy v médiu po 27,604% pri 4,5% koncentrácii glukózy v živnej pôde, čo bolo v tomto prípade aj najväčšie množstvo tohto polysacharidu v danom kmeni kvasiniek.

V nasledujúcom kmeni kvasiniek, s názvom Gyöng, sme našli najnižšie hmotnostné % beta-glukánov, a to 21,079, kultiváciou týchto kvasiniek na živnom médiu s koncentráciou glukózy 3,5% a približne rovnaké hodnoty – 29,603 a 29,634% - sme zistili pri 2,5 a 3%-nom obsahu glukózy v kultivačnom médiu.

Posledný kmeň kvasiniek, Kolín, obsahoval vo svojich bunkách najmenšie množstvo sledovaných polysacharidov v porovnaní s predchádzajúcimi dvomi kmeňmi. Najnižší obsah beta-glukánu v danom kmeni sme zistili vo vzorke kvasiniek kultivovanej na YPD médiu s 2% glukózy a to 12,939%. V živnom médiu s 3,5%-nou koncentráciou glukózy sme našli 22,307 hmotnostných % beta-glukánu, čo predstavovalo jeho najvyššie množstvo v tomto kmeni kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*.

Získané výsledky z analýz troch kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* týkajúce sa prítomnosti beta-glukánov v týchto mikroorganizmoch poukazujú na

skutočnosť, že kvasinky môžu byť zdrojom daných polysacharidov ako pre humánnu, tak i pre výživu zvierat.

Zoznam použitej literatúry

AKRAMIENĚ, DALIA et al. 2007. Effects of β -glucans on the immune system. In *Medicina* [online], roč. 43, 2007, č. 8, s. 597-606 [cit. 2011-01-23]. Dostupné na: <<http://medicina.kmu.lt/0708/0708-01e.pdf>>. ISSN 1648-9144.

ALWIS, UDENI K. – MANDRYK, JOHN – HOCKING, ALISA D. 1999. Exposure to biohazards in wood dust: bacteria, fungi, endotoxins, and (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans. In *Applied occupational and environmental hygiene* [online], roč. 14, 1999, č. 9, s. 598-608 [cit. 2010-01-22]. Dostupné na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510522>>. ISSN 1521-0898.

Apiglukan = betaglukan a včelí med, ideální kombinace pro zdraví. [online]. [cit. 2010.02.23]. Dostupné na: <<http://apiglukan.cz/beta-glukan%20studie.doc>>.

AQUILAR-USCANGA, B. – FRANCOIS, J. M. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. In *Letters in Applied Microbiology* [online], roč. 37, 2003, č. 3, s. 268-274 [cit. 2011-01-22]. Dostupné na: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x/pdf>>. ISSN 1472-765X.

BACIC, ANTONY – FINCHER, GEOFFREY B. – STONE, BRUCE A. 2009. *Chemistry, biochemistry and biology of (1 \rightarrow 3)- β -glucans and related polysaccharides* [online]. Oxford: Elsevier, 2009 [cit. 2010-01-22]. 667 s. Dostupné na: <http://books.google.sk/books?id=i3Jc8iZ6GHMC&pg=PA5&lpg=PA5&dq=Chemistry,+biochemistry+and+biology+of+%281%2E%28%29-%20glucans+and+related+polysaccharides&source=bl&ots=nAgKQhwBVj&sig=gexzYpudOWQb_eEfRWQQPV3AXW4&hl=sk&ei=KLSRTbfaF5DRsgaaz6nQBg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=7&ved=0CFQQ6AEwBg#v=onepage&q=Chemistry%20biochemistry%20and%20biology%20of%20glucans%20and%20related%20polysaccharides&f=false> ISBN 978-0-12-373971-1.

BEIJER, LENA – THORN, JÖRGEN – RYLANDER, RAGNAR. 2002. Effects after inhalation of (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan and relation to mould exposure in the home. In

Mediators of Inflammation [online], roč. 11, 2002, č. 3, s. 149-154 [cit. 2010-01-22]. Dostupné na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1781656/>>. ISSN 0962-9351.

BERKA, TOMÁŠ – KŘIVKA, ALEŠ – HULÍK, MICHAL. 2002. Ideální forma eliminace výskytu bachorových indigescí u dojnic. In *Vetweb* [online], 2002, [cit. 2007-11-10]. Dostupné na: <<http://web.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=3574>>. ISSN 1214-7648.

Biotechnologické aplikace mikroorganismů. [online]. [cit. 2008.03.26]. Dostupné na : <<http://www.vscht.cz/kch/download/sylaby/bam-mag.pdf>>.

BLAYLOCK, RUSSELL L. 2002. Yeast β -1,3-glucan and its use against anthrax infection and in the treatment of cancer. In *The journal of the american nutraceutical association* [online], roč. 5, 2002, č. 2, [cit. 2011-02-23]. Dostupné na: <<http://www.wellmune.com/pdf/glucan-reprint5-2.pdf>>. ISSN 1521-4524.

BROWN, GORDON D. – GORDON, SIAMON. 2003. Fungal β -glucans and mammalian immunity. In *Immunity* [online], roč. 19, 2003, č. 3, s. 311-315 [cit. 2009-10-22]. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WSP-49KGV2J-3&_user=3838281&_coverDate=09%2F30%2F2003&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1697752910&_rurlOrigin=scholar.google&_acct=C000061504&_version=1&_urlVersion=0&_userid=3838281&md5=f42f595b6b609431d140f46ff6e67827&searchtype=a>. ISSN 1097-4180.

CID, VICTOR J. et al. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Microbiological reviews* [online], roč. 59, 1995, č. 3, s. 345-386 [cit. 2010-02-21]. Dostupné na: <<http://mmbr.asm.org/cgi/reprint/59/3/345>>. ISSN 0146-0749.

ČEJKOVÁ, ALENA. *Biotechnologické aplikace mikroorganismů*. [online]. [cit. 2008.03.26]. Dostupné na : <<http://www.vscht.cz/kch/download/sylaby/bam-mag.pdf>>.

DALLIES, NATHALIE – FRANCOIS, JEAN – PAQUET, VERONIQUE. 1998. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to cell wall detective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Yeast* [online], roč. 14, 1998, s. 1297-1306 [cit. 2011-03-01]. Dostupné na: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0061%281998100%2914:14%3C1297::AID-YEA310%3E3.0.CO;2-L/pdf>>. ISSN 1097-0061.

DANIELSON, MICHAEL E. et al. 2010. Enzymatic Method To Measure β -1,3- β -1,6-Glucan Content in Extracts and Formulated Products (GEM Assay). In *Journal of agricultural and food chemistry* [online], roč. 58, 2010, s. 10305-10308 [cit. 2011-03-01]. Dostupné na: <<http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf102003m>>. ISSN 0021-8561.

Efektívny a účinný nástroj na posilnenie imunity. In *Štýl & Elegancia*, 2011. s. 22. ISSN 1786-4208.

FREIMUND, STEFAN et al. 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3-b-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Carbohydrate polymers* [online], roč. 54, 2003, s. 159-171 [cit. 2010-02-19]. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TFD-496FRN3-1-10&_cdi=5224&_user=3838281&_pii=S0144861703001620&_orig=search&_coverDate=11%2F01%2F2003&_sk=999459997&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWz&md5=5e4dad1c94ba79e905ef3293439abf92&ie=/sdarticle.pdf>. ISSN 0144-8617.

GÖRNER, FRIDRICH – VALÍK, EUBOMÍR. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé centrum, 2004. s. 63- 64. ISBN 80-967064-9-7.

CHEN, JIEZHONG – SEVIOUR, ROBERT. 2007. Medicinal importance of fungal β -(1/3), (1/6)-glucans. In *Mycological research* [online], roč. 111, 2007, s. 635-652 [cit. 2010-03-3]. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B7XMR-4N6NK3M-1-7&_cdi=29677&_user=3838281&_pii=S0953756207000573&_orig=search&_coverDate=

06%2F30%2F2007&_sk=998889993&view=c&wchp=dGLzVtb-zSkzk&md5=47da008562b881e4261a55c87f68fa67&ie=/sdarticle.pdf>. ISSN 1469-8102.

CHOVANCOVÁ, ANNA – ŠTURDÍK, ERNEST. 2005. Vplyv beta-glukánov na imunitný systém človeka. In *Nova Biotechnologica: V-1*. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda, 2005, s. 105-121. ISSN 1337-8783.

JAEHRIG, SILKE. C. et al. 2008. Antioxidative activity of (1-3), (1-6)-b-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. In *Food science and technology* [online], roč. 41, 2008, s. 868-877 [cit. 2010-03-13]. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6WMV-4P06CS8-1-F&_cdi=6944&_user=3838281&_pii=S0023643807002228&_orig=search&_coverDate=06%2F30%2F2008&_sk=999589994&view=c&wchp=dGLbVlz-zSkWb&md5=8a0df9b0614b82570b0fdb285da3511d&ie=/sdarticle.pdf>. ISSN 0023-6438.

JIGAMI, YOSHIFUMI. – ODANI, TETSUJI. 1999. Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. In *Biochimica et biophysica acta* [online], roč. 1426, 1999, č. 2, s. 335-345 [cit. 2010-02-16]. Dostupné na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878815>>. ISSN 0006-3002.

KACLÍKOVÁ, E. 1996. Tvorba extracelulárnych organických kyselín mutantami kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. In *Bulletin potravinárskeho výskumu*, roč. 35, 1996, č.3, s. 135-136. ISSN 0231-9950.

KIM, KHANG SUK – YUN, HYUN SHIK. 2006. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Enzyme and microbial technology* [online], roč. 39, 2006, č. 496-500 [cit. 2010-03-13]. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6TG1-4JP9FX9-8-C&_cdi=5241&_user=3838281&_pii=S0141022906001128&_orig=search&_coverDate=07%2F03%2F2006&_sk=999609996&view=c&wchp=dGLbVtz-zSkWA&md5=3bcc2886fd87970154f8a94cefbb526e&ie=/sdarticle.pdf>. ISSN 0141-0229.

KLIS, FRANS M. et al. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. In *FEMS Microbiology Reviews* [online], roč. 26, 2002, č. 3, s. 317-343 [cit. 2010-03-16]. Dostupné na:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x/pdf>>. ISSN 1574-6976.

KOCKOVÁ – KRATOCHVÍLOVÁ, ANNA. 1982. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. Bratislava : Alfa, 1982. 488 s.

KOLLÁR, ROMAN et al. 1997. Architecture of the yeast cell wall. In *The journal of biological chemistry* [online], roč. 272, 2002, č. 28, s. 17762-17775 [cit. 2010-03-16]. Dostupné na: <<http://www.jbc.org/content/272/28/17762.full.pdf+html>>. ISSN 1083-351X.

Kvasinky. 2010 [online], aktualizované 2011. [cit. 2010.03.02]. Dostupné na: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky>>.

Kvasinkovité mikroorganizmy. [online]. [cit. 2008.03.26]. Dostupné na : <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/kvasmikro/kvasmikro.html>>.

KULOVANÁ, ELIŠKA. 2001. Vyšší zatížení mykotoxiny odstranit kvasinkami. In *Agroweb* [online], 2001, [cit. 2007.03.15]. Dostupné na: <http://www.agroweb.cz/Vyssi-zatizeni-mykotoxiny-odstranit-kvasinkami__s45x9708.html>. ISSN 1214-7621.

LESAGE, GUILLAME – BUSSEY, HOWARD. 2006. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Microbiology and molecular biology reviews* [online], roč. 70, 2006, č. 2, s. 317-343 [cit. 2010-03-13]. Dostupné na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489534/pdf/0038-05.pdf/?tool=pmcentrez>>. ISSN 1098-5557.

LEVESQUE, MICHAEL. 2009. *Beta-1,3-glucan:extraordinary immune support*. [online]. B. m. : b. v., 2009 [cit. 2011.02.15]. Dostupné na :

<<http://vitaminsinamerica.com/2009/03/beta-13-glucan-extraordinary-immune-support.html>>.

LIPKE, PETER N. – OVALLE, RAFAEL. 1998. Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. In *Journal of bacteriology* [online], roč. 180, 1998, č. 15, s. 3735-3740 [cit. 2010-01-07]. Dostupné na:

<<http://jb.asm.org/cgi/content/full/180/15/3735>>. ISSN 1098-5530.

LIU, XIAO-YONG et al. 2008. A new isolation method of β -d-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Food hydrocolloids* [online], roč. 22, 2008, č. 239-247 [cit. 2010-01-27]. Dostupné na:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6VP9-4MNYK0H-1-F&_cdi=6201&_user=3838281&_pii=S0268005X06002773&_orig=search&_coverDate=03%2F31%2F2008&_sk=999779997&view=c&wchp=dGLzVtz-zSkWA&md5=275239ceeacb4c3aff71ccbe2f32dfcc&ie=/sdarticle.pdf>. ISSN 0268-005X.

LUKÁCSOVÁ, M. 2001. Vplyv živých kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* na metabolizmus energie, acidobázickú rovnováhu a na produkciu mlieka vysokoúžitkových kráv. In *Slovenský chov*, roč. 6, 2001, č. 5, s. 46. ISSN 1335-1990.

MAGNANI, MARCIANE et al. 2009. Optimized methodology for extraction of (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-b-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. In *Carbohydrate polymers* [online], roč. 78, 2009, s. 658-665 [cit. 2010-01-22]. Dostupné na:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6TFD-4WGF12V-5-7&_cdi=5224&_user=3838281&_pii=S0144861709003051&_orig=search&_coverDate=11%2F17%2F2009&_sk=999219995&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkzV&md5=cb508041b811dfb469143f8160686f04&ie=/sdarticle.pdf>. ISSN 0144-8617.

MARŠÁLEK, JAN – HRNČÍŘ, ŠTĚPÁN. 2000. β -D-glukany jako imunomodulátory pro naše zdraví. In *Výživa a potraviny*, roč. 55, 2000, č.6, s. 187-188.

MAZÁŇ, MARIÁN – MAZÁŇOVÁ, KATARÍNA – FARKAŠ, VLADIMÍR. 2006. Bunková stena húb - výzva pre výskum nových antimykotík. In *Chemické listy*, roč. 100, 2006, s. 433-439. ISSN 1213-7103.

MEIXNER, FRANTIŠEK. 2001. Kvasinkové kultúry jako probiotika pro přežvýkavce. In *Agroweb* [online], 2001, [cit. 2007-03-15]. Dostupné na: <http://www.agroweb.cz/Kvasinkove-kultury-jako-probiotika-pro-prezvykavce__s45x2690.html>. ISSN 1214-7621.

Methodology to determine the level of beta-1,3/1,6-glucans. 2007. [online]. [cit. 2011.03.03]. Dostupné na: <<http://www.europharma.cl/download/estudios/23-%20Methodology%20to%20determine%20the%20level%20of%20beta%20glucans.pdf>>.

MINÁRIK, ERICH – NAVARA, ANTON. 1986. *Chémia a mikrobiológia vína*. Bratislava: Príroda, 1986. s. 560.

Moderná výživa športových a chovných koní. [online]. [cit. 2007.04.03]. Dostupné na: <<http://www.rancnalazoch.estranky.sk/clanky/krmenie-/moderna-vyziva-sportovych-a-chovnych-koni>>.

NOVÁK, MIROSLAV. 2007. β -glukany, historie a súčasnosť. In *Chemické listy*, roč. 101, 2007, s. 872-880. ISSN 1213-7103.

NOVÁK, MIROSLAV – VĚTVIČKA, VÁCLAV. 2009. Glucans as biological response modifiers. In *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* [online], roč. 9, 2009, s. 67-75 [cit. 2011-01-24]. Dostupné na: <<http://www.bentham.org/cdtiemd/samples/emiddt9-1/0006V.pdf>>. ISSN 1871-5303.

Pekařské kvasinky v moderních biotechnológiách. [online]. [cit. 2008.03.23]. Dostupné na: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pekkvas/pekkvas.html>>.

Pivovarské kvasinky v moderních biotechnológiách. [online]. [cit. 2008.03.26]. Dostupné na: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pivokvas/pivokvas.html>>.

Pivovarské kvasnice – všední zázrak. [online]. [cit. 2008.03.23]. Dostupné na: <<http://www.pangamin.cz/sk/web/clanek?klic=5>>.

QUEROL, AMPARO – FLEET, GRAHAM. H. 2006. *Yeast in food and beverages: The yeast handbook*. [online]. Berlin: Springer, 2006 [cit. 2011-01-22] 453 s. Dostupné na: <<http://www.springerlink.com/content/978-3-540-28388-1#section=430051&page=1>> ISBN 978-3-540-28388-1.

RAST, DORA M. et al. 2003. Cell wall-associated enzymes in fungi. In *Phytochemistry* [online], roč. 64, 2003, č. 2, s. 339-366 [cit. 2010-01-21]. Dostupné na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12943752>>. ISSN 1873-3700.

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

ROSYPAL, STANISLAV et al. 2003. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. s. 49. ISBN 80-7183-268-5.

RYLANDER, R. – THORN, J. – ATTEFORS, R. 1999. Airways inflammation among workers in industry. In *European respiratory journal* [online], roč. 13, 1999, s. 1151-1157 [cit. 2010-01-12]. Dostupné na: <<http://erj.ersjournals.com/cgi/reprint/13/5/1151>>. ISSN 1399-3003.

Saccharomyces cerevisiae. 2009 [online], aktualizované 2010. [cit. 2007.12.02]. Dostupné na: <http://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae>.

Saccharomyces cerevisiae Hansen. [online]. [cit. 2007.03.15]. Dostupné na: <<http://w1.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/sacch.htm>>.

SATO, M. et al. 2003. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. In *Journal of immunology* [online], roč. 171, 2003, č. 1, s. 417-425 [cit. 2010-01-12]. Dostupné na:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12817025>>. ISSN 1550-6606.

SCHULLER, DORIT – CASAL, MARGARIDA. 2005. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. In *Applied microbiology and biotechnology* [online], roč. 68, 2005, č. 3, 292-304 [cit. 2008-01-12]. Dostupné na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15856224>>. ISSN 1432-0614.

SHAHINIAN, SERGE – BUSSEY, HOWARD. 2000. Beta-1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Molecular biology* [online], roč. 35, 2000, č. 3, s. 477-489 [cit. 2010-01-12]. Dostupné na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672173>>. ISSN 1365-2958.

ŠILHÁNKOVÁ, LUDMILA. 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologu*. Praha: ACADEMIA, 2008. s. 60. ISBN 978-80-200-1703.

ŠIPICKÝ, MATEJ – ŠUBÍK, JÚLIUS. 1992. *Genetika kvasiniek*. Bratislava: VEDA, 1992. 312 s. ISBN 80-224-0396-2.

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

TANČINOVÁ, DANA. et al. 2008. *Mikrobiológia potravín*. 2. Vyd. Nitra: SPU, 2008. s. 15-16. ISBN 978-80-552-0145-0.

TANČINOVÁ, DANA – LABUDA, ROMAN. 2009. *Mykológia*. Nitra: SPU, 2009. s 82-95. ISBN 978-80-552-0162-7.

TANRIVERDI, PINAR et al. 2005. The effects of selective nitric oxide synthase blocker on survival, mesenteric blood flow and multiple organ failure induced by zymosan. In *The journal of surgical research* [online], roč. 124, 2005, č. 1, s. 67-73 [cit. 2008-01-12]. Dostupné na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734481>>. ISSN 1095-8673.

Tretia časť 22. hlava - Droždie a sušené pivovarské kvasnice. 2000 [online]. [cit. 2009.10.22]. Dostupné na: <http://www.svssr.sk/sk/legislativa/kodex_03_22.asp>.

UHRÍN, VLADIMÍR – UHRÍN, PAVEL. 1995. *Základy molekulárnej biológie*. Nitra: VŠP, 1995. s. 39. ISBN 80-7137-200-5.

VĚTVIČKA, VÁCLAV. 2004. Chytrý glukan. In *Chemické listy*, roč. 98, 2004, s. 963. ISSN 1213-7103.

VĚTVIČKA, VÁCLAV. *Betaglukany*. 2008 [online]. [cit. 2009.10.22]. Dostupné na : <<http://www.betaglukan.cz/>>.

VĚTVIČKA, VÁCLAV et al. 2002. Pilot study: Orally-Administration yeast β -1,3-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. In *The journal of the american nutraceutical asociation*. [online], roč. 5, 2002, č. 2 [cit. 2011-02-12]. Dostupné na: <<http://www.wellmune.com/pdf/glucan-reprint5-2.pdf>>. ISSN 1521-4524.

VODRÁŽKA, ZDENĚK. 1991. *Biotechnologie*. 2. vyd. Praha : Vysoká škola chemicko - technologická, 1991. s. 33. ISBN 80-7080-121-2.

VOLMAN, JULIA J. – RAMAKERS, JULIAN D. – PLAT, JOGCHUM. 2008. Dietary modulation of immune function by β -glucans. In *Physiology&Behavior* [online], roč. 94, 2008, s. 276-284 [cit. 2008-01-12]. Dostupné na:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T0P-4R8NBDN-1&_user=3838281&_coverDate=05%2F23%2F2008&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1697794969&_returnOrigin=google&_acct=C000061504&_version=1&_urlVersion=0&_userid=3838281&_mdd5=b4e4d8520376d8dd4c12276694d4c6b8&searchtype=a>. ISSN 0031-9384.

Využití kvasinek pro produkci biomasy. [online]. [cit. 2007.10.13]. Dostupné na: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/bio/produkce.html>>.

WHEATCROFT, RAGINI et al. 2002. *Production of beta-glucan-mannan preparations by autolysis of cells under certain pH, temperature and time conditions*. [online]. [cit. 2011.02.13]. Dostupné na: <<http://www.patentgenius.com/patent/6444448.html>>.

Yeast betaglucan. 2005. [online]. [cit. 2011.02.13]. Dostupné na: <<http://www.vitaminpros.com/yeast-beta-glucan.htm>>.

YOSHIOKA, SHOICHI et al. 1998. Immunotoxicity of soluble β -glucans induced by indomethacin treatment. In *FEMS Immunology and medical microbiology* [online], roč. 21, 1998, č. 3, s. 171 [cit. 2010-01-12]. Dostupné na:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T2T-3TCW8R4-1&_user=3838281&_coverDate=07%2F31%2F1998&_alid=1255286026&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=4927&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=8&_acct=C000061504&_version=1&_urlVersion=0&_userid=3838281&md5=e27a8698a3c24c7308776bb054e61d67>. ISSN 1574-695X.

YOUNG, SHIH-HOUNG – CASTRANOVA, VINCENT. 2005. *Toxicology of 1 \rightarrow 3-Beta-glucans: Glucans as Marker for fungal exposure*. [online] Informa healthcare, 2005 [cit. 2011-01-25] s. 70. Dostupné na: <http://www.ebook3000.com/Toxicology-of-1---3-Beta-Glucans--Glucans-as-a-Marker-for-Fungal-Exposure_40319.html> ISBN 0-415-70037.

ZIGOVÁ, JANA – ŠTURDÍK, ERNEST. 1999. Bioinžinierske aspekty produkcie biomasy *Saccharomyces cerevisiae* ako zdroja špeciálnych proteínov. In *Biologické listy*, roč. 64, 1999, č.1, s. 35-40. ISSN 0366-0486.