UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

Kvasinky rodu *Saccharomyces*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016 **Petra Stehlíková**

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky a strávený čas a trpělivost, kterou mi věnovala po dobu zpracování této bakalářské práce. Dále chci poděkovat, za poskytnutou literaturu a ilustrace, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.
Poděkovaní také patří mé rodině, přátelům a kolegům v práci, kteří za mnou trpělivě stáli a podporovali mě.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorských dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 26. 8. 2016 Petra Stehlíková

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Petra Stehlíková

Školitel: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Název bakalářské práce: **Kvasinky rodu *Saccharomyces***

Tato rešeršní bakalářská práce vznikla za účelem základního shrnutí poznatků o kvasinkách rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Cílem je utvořit ucelený přehled o těchto kvasinkách. Práce je rozdělena do několika na sebe navazujících částí.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je hojně využívanou kvasinkou zejména v potravinářském průmyslu. Proto se také nazývá pivní, vinná nebo pekařská kvasinka. Jejich genom je zcela prostudován, a tak se hojně využívá genovém inženýrství. Ale jsou zdokumentovány i případy patogeneze.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je jednou z velmi zajímavých a hojně využívaných kvasinek.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Petra Stehlíková

Trainer: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Title: **Kvasinky rodu *Saccharomyces***

This thesis was the search for basic general knowledge of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The aim is to create a comprehensive overview of these yeast. The work is divided into several consecutive parts.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* yeast is widely used especially in food industry. Therefore it is also called the beer, wine, or baker's yeast. Their genome is fully studied, and thus are widely used genetic engineering. But there are also documented cases of pathogenesis.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most interesting and widely used yeast.

Obsah

1 Úvod ... 9
2 Zadání - Cíl práce ... 10
3 OBECNÉ VLASTNOSTI RODU *SACCHAROMYCES* ... 11
3.1 Taxonomie ... 11
3.2 Stavba buňky ... 11
3.2.1 Buněčná stěna ... 12
3.2.2 Cytoplazmatická membrána ... 12
3.2.3 Cytoplazma ... 12
3.2.4 Jádro ... 13
3.3 Morfologie a rozmnožování ... 13
3.4 Chemické složení ... 13
3.5 Růst ... 14
3.6 Metabolismus ... 15
3.6.1 Tvorba alkoholu a oxidu uhličitého (CO_2) ... 15
3.6.2 Oxidace sacharidů (Glykolýza) ... 15
4 METODY LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY ... 17
4.1 Mikroskopie ... 17
4.1.1 Nativní preparát ... 17
4.1.2 Fixovaný (barvený) preparát ... 18
4.2 Kultivace ... 19
4.2.1 Kultivační média ... 19
4.3 Biochemická identifikace ... 21
4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR) ... 22
4.5 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie ... 24
5 PATOGENEZE ... 24
6 *S. CEREVISIAE* A JEJÍ VYUŽITÍ ... 26
6.1 Modelový organismus ... 27
6.2 Produkce rekombinantních proteinů ... 27
6.3 Potravinářství ... 27
6.3.1 Pivní kvasinky ... 28
6.3.2 Vinné kvasinky ... 29

6.3.3 Pekařské kvasinky 29
6.3.4 Lihovarské kvasinky 29
7 DISKUSE A ZÁVĚR 31
8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK 33
9 Literatura 34

SEZNAM ZKRATEK:

AIDS	*Acquired Immunodeficiency Syndrom* (Syndrom získaného selhání imunity)
ASCA	Autoprotilátky proti *Saccharomyces cerevisiae*
ATP	Adenosintrifosfát
C.	*Candida*
DNA	Deoxiribonukleová kyselina
dsDNA	Dvouvláknová deoxiribonukleová kyselina
ER	Endoplazmatické retikulum
GA	Golgiho aparát
GC	Guanino-cytosin
KOH	Hydroxid draselný
MALDI	*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (ionizace laserem za přítomnosti matrice)
MS	Hmostnostní spektrometr
NAD^+	Oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OMPC	Protilátky proti porinu-C
PCR	Polymerase Chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
S.	*Saccharomyces*
TOF	*Time of Flight* (doba letu)
VVC	Vulvovaginální kandidóza

1 Úvod

Rod kvasinek *Saccharomyces* je reprezentován především druhem *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Tento druh je nejvíce spojován s ovocem, zeleninou a dalšími potravinářskými výrobky. Může ale být také součástí mikroflóry člověka, ovšem ne tak často jako *S. boulardii* (*Anaissie, 2003*).

Kvasinka *S. cerevisiae* je využívána v molekulární biologii jako nejjednodušší modelový organismus pro studium různých procesů u eukaryotních buněk. Například byla použita pro studium stárnutí, regulace genové exprese, přenos signálů, dále pak pro studium buněčného genomu, metabolismu a apoptózy a v neposlední řadě pro studie neurodegenerativních onemocnění (*Kurtzman, 2000*).

S. cerevisiae je ovšem nejznámější jako pekařská nebo pivovarská kvasinka, používaná při pečení chleba a výrobě piva. Kromě jejího využití v potravinářském průmyslu, je také známým původcem infekcí. Kvasinky *S. cerevisiae* napadají slizniční povrchy u pacientů s jiným primárním onemocněním, zejména pak u pacientů s narušeným imunitním systémem. To ukazuje na to, že *S. cerevisiae* je podmíněný patogen, ale u imunokompromitovaných pacientů může způsobit invazivní oportunní onemocnění. Mezi primární onemocnění spojené s invazivní *S. cerevisiae* infekcí patří nádorové bujení, AIDS, myelodysplastický syndrom, popáleniny a revmatoidní artritida (*Anaissie, 2003*).

2 Zadání - Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo zpracovat pomocí literární rešerše všeobecné poznatky o rodu kvasinek *Saccharomyces*. Mým záměrem je, nejen obecně popsat tento rod, ale zaměřím se též na jeho využití, ať už v potravinářství nebo jako modelového organismu v genetice. Dalším bodem jsou onemocnění způsobená *Sccharomyces cervisiae* a jejich laboratorní diagnostika.

3 OBECNÉ VLASTNOSTI RODU *SACCHAROMYCES*

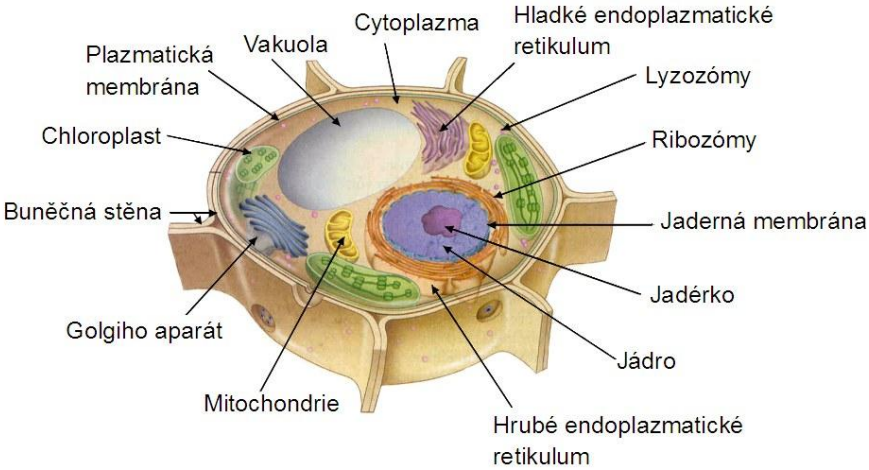
Název je odvozen od latinského názvu *Saccharo* (cukr) a *myces* (houba). Kvasinky rodu *Saccharomyces* patří mezi jednobuněčné eukaryotní mikroorganismy (houby). Jde o jednoduchý a odolný organismus, který se při dostatečném přísunu potravy dokáže rychle rozmnožovat. Pro své dobré vlastnosti se využívá jako minimální model eukaryotních buněk. Například druh *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) je využíván v pivovarnictví, vinařství a pekařství. Jelikož jádro obsahuje dostatečné množství DNA, je využíván pro genetickou analýzu. Kvasinky tak dopomohly k zásadním poznatkům o základních mechanismech v eukaryotních buňkách včetně buněčného cyklu (*Anaissie, 2003*).

3.1 Taxonomie

S. cerevisiae patří do domény Eukaryota, říše Fungi. Dle způsobu rozmnožování jsou zařazeny do oddělení Ascomycota – vřeckovýtrusé houby, pododdělení Saccharomycotina, řád Saccharomycetales, třída Saccharomycetaceae, rod *Saccharomyces* a druh *Saccharomyces cerevisiae* (*Federhen, 2012*).

3.2 Stavba buňky

Kvasinky mají strukturu eukaryotní buňky (obrázek č. 1). Buňku tvoří pevná a silná buněčná stěna, pod kterou se nachází tenká cytoplazmatická membrána obklopující cytoplazmu. V cytoplazmě se nachází jádro a řada dalších organel nezbytných pro specifické buněčné procesy (*Zdeňková, 2008*).



***Obrázek č. 1**: Eukaryotická buňka (přejato z http://sszdra-karvina.cz/bunka/bi/03eu/obr/ucrost.jpg)*

3.2.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna tvoří vnější povrch kvasinky a díky své síle a pevnosti udává buňce tvar a zároveň buňku ochraňuje před mechanickými vlivy. U *S. cerevisiae* se jedná o trojrozměrnou strukturu, kterou tvoří hlavně látky polysacharidového charakteru (80 % sušiny). Mezi tyto látky patří β-1,3-glukan, β-1,6-glukan, glykolyzované bílkoviny (mannanproteiny) a chitin. Na udržení tvaru buňky se podílejí vlákna glukanu, které tvoří vnitřní vrstvu buněčné stěny. Mannan, který se nachází na vnější vrstvě, reguluje permeabilitu buněčné membrány. Chitin nejčastěji nacházíme v oblasti jizev, které vznikají na povrchu membrány v oblasti oddělení pupenu (*Zdeňková, 2008*).

3.2.2 Cytoplazmatická membrána

Tato vrstva tvoří ohraničení celé buňky a vychlipuje se do cytoplazmy. Je složena z proteinů a lipidů a její tloušťka je 7,5 až 8 nm. Pomocí této membrány se uskutečňuje transport látek z vnějšího prostředí do nitra buňky a naopak z buňky do jejího okolí pomocí přenašeče (specifický protein) (*Kopecká, 2009*).

3.2.3 Cytoplazma

Je to průhledná homogenní hmota, která obsahuje řadu organel. K nejvýznamnějším organelám patří endoplazmatické retikulum (ER). Jedná se o labyrintovou organelu, která je tvořena systémem dvojitých membrán. ER dělíme na drsné a hladké. Drsné ER obsahuje na povrchu ribozomy využívané k syntéze bílkovin. Hladké ER již ribozomy neobsahuje a je místem, kde probíhá syntéza lipidů. Dominantou cytoplazmy jsou mitochondrie. Mají rozmanitý tvar a velikost. Jsou obklopeny vnější bradavičnatou membránou a vnitřní membránou vychlipující se do středu mitochondrie a tvořící kristy (*Zdeňková, 2008*). Jsou sídlem buněčné respirace (*Alberts, 1998*). V cytoplazmě se dále nachází vakuola kulovitého tvaru, která je obklopená jednoduchou membránou. Mladší a pučící kvasinky obsahují několik malých vakuol. Starší buňky mají uvnitř jednu velkou vakuolu, která může vyplňovat celou cytoplazmu. Vakuola obsahuje hydrolytické enzymy (proteinázy, esterázy a ribonukleázy) (*Zdeňková, 2008*). Další membránovou strukturou je Golgiho aparát (GA) tvořený zploštělými membránovými váčky. Jeho funkcí je příjem a přeměna molekul vyrobených ER, které pak dále směřuje do okolí buňky nebo jejích částí. Jak v cytoplazmě,

tak i v jádře se nachází síť proteinových vláken, která tvoří cytoskelet. Cytoskelet slouží k udržení tvaru buňky a zodpovídá za buněčný pohyb, tedy za vnitřní pohyb organel (*Škodová, 2008*).

3.2.4 Jádro

Kvasinky mají jádro odděleno od cytoplazmy dvojitou jadernou membránou. V membráně se nacházejí velké póry, které regulují výměnu látek mezi cytoplazmou a jádrem. Pokud je struktura jádra dostatečně výrazná lze ji pozorovat ve fázovém mikroskopu. Nejlépe prostudované jádro je právě u *S. cerevisiae.* V haploidním jádře se nachází 16 chromozomů. Jádro obsahuje také nízkomolekulární DNA (2 µm), která se využívá pro genové inženýrství (*Škodová, 2008*).

3.3 Morfologie a rozmnožování

Tvar kvasinek *S. cerevisiae* je okrouhlý nebo vejčitý. Velikost se pohybuje okolo 10 µm. Mycelium není běžně vytvořeno, ale tvoří se tzv. pseudomycelium (*Podstatová, 2001*). Kvasinky se rozmnožují vegetativně multilaterálním pučením. Po oddělení dceřiné buňky můžeme jak na mateřské, tak na dceřiné buňce pozorovat jizvu. Dle počtu těchto jizev na mateřské buňce lze určit stáří kvasinky. Během stárnutí dochází k morfologickým a fyziologickým změnám např.: zvětšení buňky, vrásnění buněčné stěny, rostoucí počet jizev, zvýšení generační doby, atd. (*Basařová et al., 2010*).

3.4 Chemické složení

Buňka kvasinek *S. cerevisiae* se skládá hlavně z vody. Voda zabírá 60-85 % sušiny buňky. Složení sušiny kvasinky je proměnlivé v závislosti na stáří buňky, jejím fyziologickém stavu a změnám složení substrátu. V sušině jsou dále přítomny sacharidy a to monosacharidy, polysacharidy a oligosacharidy, jejich deriváty a substituované sacharidy. V buněčné stěně jsou důležité polysacharidy jako mannan a glukan. Zbylé polysacharidy obsahuje cytoplazma (glykogen a mannan). Cytoplazma dále obsahuje barvitelné inkluze, bílkoviny, lipidy a jiné zásobní látky. Kvasinky obsahují dusíkaté látky téměř ve všech formách. Aminokyseliny jsou důležité pro proteosyntézu a metabolismus dalších látek. Lipidy jsou důležitou složkou mitochondrií a buněčné membrány. Některé

lipidy přímo regulují propustnost buněčné stěny, čímž ovlivňují transport substrátů do buňky. Další složkou membrán jsou steroly, které jsou důležité pro jejich konzistenci a propustnost, pro transport aminokyselin, pirimidinů a pro respirační aktivitu kvasinek. Ergosterol je důležitý pro růst a rozmnožování kvasinek. Bez ergosterolu fermentují kvasinky pomaleji. Sušina dále obsahuje minerální látky jako fosfor, který je vázán v nukleových kyselinách, bílkovinách, lipidech a vitamínech. Dalšími minerálními látkami, které kvasinky obsahují, jsou draslík, hořčík, vápník, sodík, křemík, síra a stopové množství železa, manganu, mědi a zinku. Součástí enzymů kvasinkových buněk jsou vitamíny a to kofaktory nikotinových nukleotidů $NADPH/NAD^+$ a $NADH/NAD^+$, flavinadenindinukleotid, kyselina listová, adenosintrifosfát, kyselina tetrahydrolistová, koenzym A, atd. (*Basařová et al., 2010*).

***Tabulka č. 1**: Skupiny a význam látek v kvasničné buňce*

Sloučeniny	***Výskyt***	***Funkce***
Bílkoviny	Cytoskelet, ribozomy, aktin, tubulin	Stavba buňky, enzymy
Glykoproteiny	Buněčná stěna její enzymy	Flokulace
Polysacharidy	Buněčná stěna, cytoplasma	Stavba buňky, zásobní látky
Lipidy	Membrány	Stavební zásobní a signální látky
Nukleové kyseliny (DNA)	Jádro, mitochondrie	Zásoba genetické informace
Nukleové kyseliny (RNA)	Cytosol, mitochondrie	Přenos informace

ZDROJ: přejato z Basařová, Šavel, Basař a Lejsek, 2010, upraveno

3.5 Růst

Základní podmínky pro život jsou takové, bez kterých by se mikroorganismy nemohly rozmnožovat a růst. Mezi tyto podmínky patří teplota, kyslík, voda a živiny. Podle teplotních potřeb můžeme kvasinky zařadit mezi mezofilní mikroorganismy, pro které je teplotní optimum 35°C až 37°C. Vztahem ke kyslíku se kvasinky rodu *Saccharomyces* řadí mezi fakultativně anaerobní organismy, což jsou organismy přežívající jak v kyslíkatém tak bezkyslíkatém prostředí (*Podstatová, 2001*).

3.6 Metabolismus

Metabolismus lze popsat jako soubor chemických reakcí probíhajících v buňce. Pro tyto reakce je samozřejmě nezbytná voda (*Podstatová, 2001*).

3.6.1 Tvorba alkoholu a oxidu uhličitého (CO_2)

Hlavními metabolity kvašení neboli fermentace jsou alkohol a CO_2. Tento proces probíhá dle souhrnné rovnice.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + \text{vedlejší metabolity} + \text{teplo}$$

Vysvětlivky: *$C_6H_{12}O_6$…zkvasitelná hexóza (glukóza)*

C_2H_5OH…ethanol

3.6.2 Oxidace sacharidů (Glykolýza)

Kvašení je anaerobní proces, pomocí kterého buňky kvasinek získávají energii oxidací sacharidů bez přístupu vzduchu. Energie, která se uvolní při degradaci sacharidů, se skladuje ve formě speciálních sloučenin s makroergickými vazbami se zvýšeným obsahem volné energie. Tato energie je pak v buňce užitečně využívána například pro konstrukci základních částí buňky. Patří k nim ATP, NAD^+ a jeho redukovaná forma NADH, který z něj vzniká příjmem dvou elektronů a jednoho vodíku.

Embdenovo – Meyrhofovo – Parnasovo schéma nám zobrazuje jednotlivé kroky reakčního mechanismu anaerobní glykolýzy včetně tvorby vedlejších produktů, které určují jednotlivé metabolické dráhy dalších sloučenin.

***Tabulka č. 2**: Fermentace (přejato z Hoog, 2000, upraveno)*

Fermentace (zkvašování):	
Glukóza	+
Galaktóza	v
Sacharóza	+
Maltóza	v
Laktóza	-
Rafinóza	+
α, α - Trehalóza	-
Melibióza	+

Vysvětlivky: **+** pozitivní, **-** negativní, **v** proměnlivý

***Tabulka č. 3**: Růst (přejato z Hoog, 2000, upraveno)*

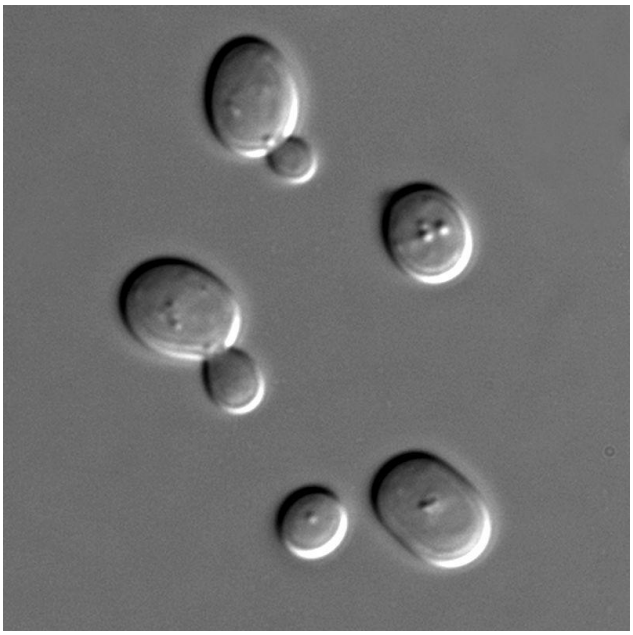
Růst					
Glukóza	+	Škrob	-	Ribstol	-
Galaktóza	v	D – xylóza	-	Galaktitol	-
L – sorbóza	-	L – arabinóza	-	D-manitol	-
Sacharóza	+	D – arabinóza	-	D-glucitol	-
Maltóza	+	D – ribóza	-	A-methyl-D-glukosid	v
Celobióza	-	L – rhamnóza	-	Salicin	-
α, α - Trehalóza	+	D – glukosamin (C)	-	D-glukonát	-
Laktóza	-	*N*-Acetyl-D-glukosamin	-	DL-laktát	v
Melibióza	v	Metanol	-	Sukcinit	v
Rafinóza	+	Etanol	+	Citrát	-
Melezitóza	v	Glycerol	-	*Myo*-inositol	-
Inulin	-	*Meso*-erythritol	-	Hexadekan	-
Vitamin-free	-	Dusičnany	-	Kadaverin	-
L-Lysin	-	Ethylamin	-	Růst ve 37°C	v

Vysvětlivky: **+** pozitivní, **-** negativní, **v** proměnlivý

4 METODY LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY

4.1 Mikroskopie

Využívá se při přímém vyšetření stanovovaného materiálu (*Podstatová, 2001*). Pro pozorování kvasinek, se využívá především světelné a fluorescenční mikroskopie. (*Melter a Malmgren, 2014*).



***Obrázek č. 2**: Buňky Saccharomyces cerevisiae v DIC mikroskopu (přejato z https://fr.wikipedia.org/wiki/Levure#/media/File:S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg)*

4.1.1 Nativní preparát

Mikroorganismy pozorujeme nefixované, tedy živé (*Podstatová, 2001*). V mykologii se využívá speciální typ nativního preparátu a tím je pozorování mikromorfologie kvasinek na nutričně chudých půdách. Mezi tyto půdy patří rýžový a kukuřičný agar (*Hamal a Jandová, 2010*).

4.1.2 Fixovaný (barvený) preparát

Barvené preparáty jsou v praxi používanější. Kvasinka se nejprve fixuje (usmrcuje) plamenem nebo chemicky (např.: metanolem). Takto připravený preparát se barví různými technikami. V mykologii se nejvíce používá barvení dle Grama, fluorescenční barvení a histologické barvení dle Grocotta a Gomoriho. Barvení dle Grama se používá především k barvení tekutých materiálů z dýchacích cest, likvoru, bioptických materiálů, hnisů, výpotků atd. a skládá z několika kroků. Nejprve se preparát barví 20–30 sekund krystalovou violetí. Poté se preparát překryje Lugolovým roztokem a nechá se působit 20–30 sekund. Ten se pak odbarvuje pomocí acetonu nebo alkoholu. Poslední fází je barvení zředěným karbolfuchinem po dobu 30-60 sekund. Preparát se opláchne a pozoruje při maximálním zvětšení (1000x) s imerzním olejem (*Podstatová, 2001*).

Obrázek č. 3*: Barvení dle Gramma (přejato z: http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/gram/gram.htm*

Mezi další fixované preparáty patří louhový preparát, který je nejpoužívanější pro pozorování kožních šupin, nehtů a vlasů. K projasnění tkání se v tomto případě využívá 10–40% roztok KOH. Zkoumaný vzorek vložíme do kapky KOH na podložním sklíčku a překryjeme krycím sklíčkem. Po 30–60 minutách se stlačením krycího sklíčka roztlačí zkoumaný materiál do tenčí vrstvy, odsaje přebytek KOH a zkoumá se suchým systémem při zvětšení 100 – 400x (*Votava, 2010*). Pro zvýraznění mykotických struktur lze KOH smíchat s barvivem (MycoInk) vázajícím se především na houbové útvary.

Fluorescenční barvení využívá enzymové aktivity kvasinek rozštěpení barviva. Tím se uvolňuje složka, která fluoreskuje v záření s vhodnou vlnovou délkou. Mezi používaná barviva patří diacetát fluoresceinu a karboxylfluoresceinu. Nejpoužívanějším barvivem pro všechny houby je však kalkoflourová běloba (Calcoflour White), která se váže na všechny mykotické útvary. Fluorescenci pak pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu při dané vlnové délce (*Basařová et al., 2010*).

4.2 Kultivace

Řadí se mezi metody přímé identifikace. Cílem kultivace je izolace čisté kultury pro její další identifikaci a charakterizaci (*Melter a Malmgren, 2014*).

Kvasinky jsou schopny rozmnožovat se a růst na neživých kultivačních půdách, na které se očkuje většina biologických materiálů.

Při podezření na systémovou mykotickou infekci se odebírají hemokultury. Jedná se o odběr do speciálních hemokultivačních lahviček (*Melter a Malmgren, 2014*). Lze využít speciálních mykologických lahviček nebo lahvičky pro aerobní kultivaci s prodlouženou dobou kultivace (10 – 14 dní). Kultivace těchto lahviček probíhá v automatizovaných systémech při teplotě 35–37°C. V případě pozitivity lahvičky se zhotoví preparát a krev se vyočkuje na živné půdy.

4.2.1 Kultivační média

Mezi kultivační média patří jednak tekuté půdy (bujón), které jsou obohacené o různé doplňky (pepton, kvasniční extrakt vitamíny, stopové prvky, atd.) a slouží zejména k pomnožení přirozené sterilních materiálů nebo materiálů, ve kterých se očekává nízká nálož kvasinky. Další variantou jsou půdy tuhé (agar) (*Votava, 2000*).

Sabouraudův agar

Skládá se z peptonu, 2% glukózy nebo maltózy. pH je kyselé, kolem 5,6 (čímž je potlačen růst vysokého počtu bakterií). Dal by se tak považovat za selektivní agar. Potlačení růstu bakterií lze zvýšit přidáním antibiotik. Komerčně dostupné typy Sabouraudových agarů se liší druhem obsahovaného cukru nebo pH (*Votava,2000*). Kvasinky

S. cerevisiae po kultivaci při 37°C (24–48 hodin) rostou na Sabouraudově glukózovém agaru jako bílé, lehce lesklé a hladké kolonie. Mají tvar hory nebo kužele, čímž se často odlišují od polokulovitých kandid. Jejich spodní strana je zbarvena do běla, ale okolní půda se nezabarvuje. Po delší inkubaci jsou některé kmeny krémové (*Fragner, 1967*).

Obrázek č. 4: Kolonie Saccharomyces cerevisiae na Sabouraudově agaru (vlastní fotografie)

4.2.1.1 Selektivní půdy k pěstování kvasinek a plísní

Novější média jsou upravena tak, že pH je neutrální a selekce nežádoucích bakterií je dosaženo přidáním antibakteriálních antibiotik v určité koncentraci (např.: chloramfenikol (0,05g/l), gentamycin (0,05g/l), vankomycin s amikacinem (oba 0,1g/l)) (*Votava, 2000*).

4.2.1.2 Diagnostické půdy

Na těchto půdách lze diagnostikovat vlastnosti kultivovaného kmene. Tím je možné určit druh nebo skupinu mikroorganismů. Většinou jde o biochemické vlastnosti. Ty jsou podmíněny tvorbou enzymů nebo jejich přítomností. Příkladem jsou cukrové půdy, pomocí

kterých se zkoumá, jestli kvasinka štěpí určité sacharidy (fermentačně, zkvašováním). To se projeví změnou pH. Dále je možné zjišťovat, zda jsou schopné růst v přítomnosti určitého substrátu (*Votava, 2000*).

4.2.1.3 Chromogenní půdy

Chromogenní půdy jsou takové půdy, které obsahují chromogeny. Chromogeny jsou v podstatě specifické substráty pro mikrobiální enzymy, čímž se řadí mezi diagnostické půdy. Chromogen vzniká vazbou chromoforu (barevná molekula) na běžný substrát, jako je např.: glukóza nebo laktóza. Specifické enzymy v mikrobiální buňce vazbu mezi chromoforem a substrátem rozruší. Substrát kvasinka využije ve svém metabolismu a nerozpustný chromofor se hromadí v mikrobiální buňce. Kvasinky pak na agaru vyrostou v typicky zbarvených koloniích. Chromogenní půdy mohou být obohacené i o inhibitory některých mikrobů. Příkladem těchto půd je CHROMagar *Candida*, HiCrome *Candida* Agar, CandiSelect, atd. Principiálně podobné jsou fluorogenní půdy, ale s obsahem fluorescenčního barviva. Takže kolonie se specifickým enzymem v UV-světle o vlnové délce 360 nm fluoreskují (*Votava, 2000*).

4.3 Biochemická identifikace

Pro podrobnější dourčování druhů kvasinek využíváme jejich biochemické, fermentační a asimilační vlastnosti (*Bednář, 1996*). Auxanogramy jsou založeny na schopnosti kvasinek asimilovat různé zdroje uhlíku nebo dusíku. Pro tento účel lze využít čistý mykologický agar v Petriho miskách, na který se po naočkování suspenze vyšetřované kandidy kladou disky s obsahem různých cukrů nebo zdrojů dusíku. Plotny se poté nechávají inkubovat a výsledná asimilační schopnost kvasinky se projeví jejím růstem (mléčným zakalením) okolo disku s příslušným substrátem. Zastoupení utilizovatelných substrátů je pro jednotlivé druhy kvasinek charakteristické. Zymogramy, na rozdíl od auxanogramů, jsou založeny na fermentaci cukrů a probíhají za nepřístupu kyslíku (Bednář et al., 1996; Mahon a Manuselis, 2000; Anaissie et al., 2003). Biochemických vlastností využívají i komerčně vyráběné testy, mezi něž patří např. CANDIDA – Screen. Tato souprava je určena pro určení dvanácti základních kvasinek včetně *Saccharomyces serevisiae.* Osm biochemických testů na dělené mikrotitrační destičce se po 24 hodinové inkubaci při 25–30°C vizuálně hodnotí.

Druh kvasinky se určí po porovnání barevné škály s kódovou knihou, která je součástí balení. Na obdobném principu je založen další test CANDIDAtest 21, který se liší počtem biochemických testů a tak i rozlišovací schopností (*MIKRO-LA-TEST katalog*). ID32 C je jedním z modernějších setů, který detekuje asimilaci 24 sacharidů, 5 organických kyselin, citlivost k cycloheximidu a kolorimetricky hydrolýzu eskulinu. Hodnocení probíhá turbidimetricky, tj. sleduje se stupeň zákalu a porovnává se s negativní kontrolou. V laboratořích často používanou soupravou je AuxaColor 2 (viz. obr. č. 5). Tento set obsahuje 15 testů, z nichž 13 prokazuje asimilaci sacharidu a alkoholů. Vyhodnocení je kolorimetrické, tj. hodnotí se změna barvy po 24–72 h inkubaci při 30°C. Pomocí této metody lze určit 28 druhů kvasinek (*Hamal a Jandová, 2010*).

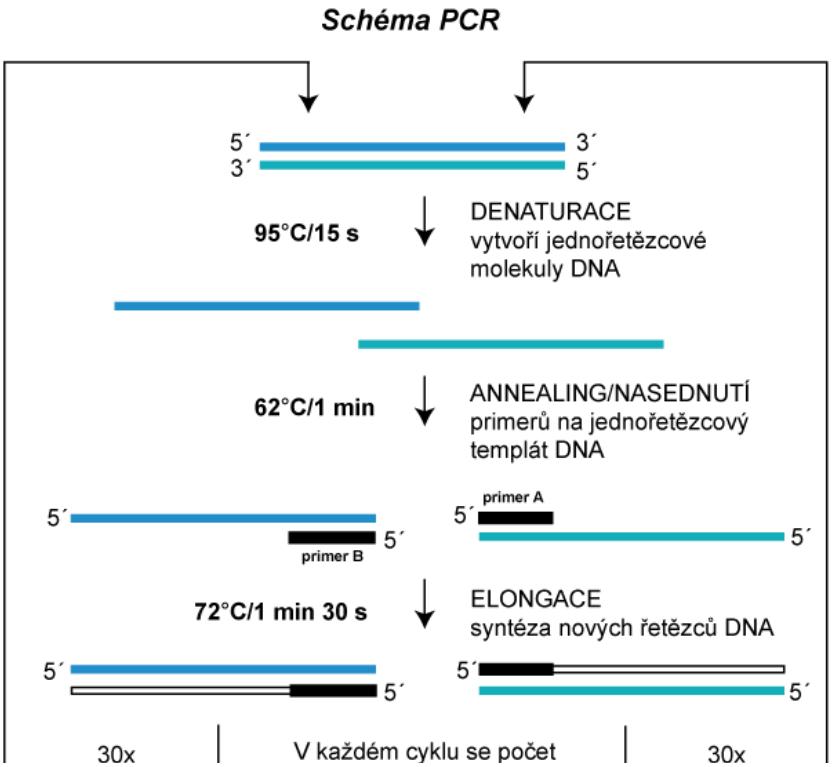
Obrázek č. 5: Komerčně vyráběný set AuxaColor 2 (vlastní fotografie)

4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je široce využívanou metodou v klinické diagnostice. Je neocenitelným nástrojem pro detekci patogenních bakterií, virů, prvoků a hub. Principem PCR je replikace nukleových kyselin bez předchozího klonování (*Šmarda, 2010*). Díky této metodě jsme schopni syntetizovat velké množství DNA dle templátové – matricové DNA, která je

v relativně malém množství. PCR probíhá ve směru 5´→ 3´ na vybraných úsecích dvouřetězcové DNA. Kromě těchto úseků DNA do reakční směsi patří 2 primery, prekurzory DNA, termostabilní polymeráza (izolovaná z termofilních mikroorganismů např. *Taq* DNA – polymeráza z *Thermus aquaticus*, který odolává teplotám denaturujícím DNA) a pufr s obsahem hořečnatých iontů (Mg^{2+}) (*Vondrejs, 1997*).

Průběh PCR je ve třech na sebe navazujících krocích, které se od sebe liší náročností na teplotu probíhající reakce. Prvním krokem je denaturace matricové dsDNA na jednořetězcové molekuly při teplotním rozmezí cca 92° - 95°C. Druhý krok probíhá v závislosti na počtu GC párů (čím více párů bází, tím vyšší teplota) v teplotním rozmezí 37° - 58°C. Po ochlazení na požadovanou teplotu se primery připojí k odděleným řetězcům DNA. Při posledním kroku se při teplotě 70° - 78°C syntetizují nové řetězce DNA za pomoci DNA – polymerázy. Doporučuje se *Taq* – polymeráza, která má teplotní optimum 72°C. Po vytvoření DNA kopie dle matrice se celý sled reakcí několikrát opakuje (*Vondrejs, 1997*).



***Obrázek č. 6**: Schéma PCR (přejato z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1485&typ=html)*

4.5 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*) patří v současné době mezi jednu z nejrozšířenějších fenotypových metod používaných k spolehlivé identifikaci bakterií i kvasinek. Touto metodou srovnávají hmotnostní spektra biomolekul, zejména pak proteinů, vyšetřovaného vzorku se spektry známých mikroorganismů. Vzorek pro tuto analýzu se připraví tak, že odebere kvasinková kolonie narostlá na kultivační půdě, nanese se na ocelovou destičku a překryje se matricí (např. kyselina skořicová). Tato matrice absorbuje energii z laserového pulsu a tím zabrání fragmentaci biomolekul, které jsou analyzovány. Biomolekuly jsou následně ionizovány, separovány a přístroj měří čas letu. Analyzátor vytvoří hmotnostní spektrum, které je pak automaticky porovnáno s databází známých hmotnostních spekter a dle toho identifikován zkoumaný mikroorganismus (*Melter a Malmgren, 2014*).

5 PATOGENEZE

Kvasinka *S. cerevisiae* není u zdravých jedinců považována za patogen. V současnosti jsou ale zdokumentovány případy klinických infekcí způsobených kvasinkou *S. cerevisiae*, zejména pak u imunnokompromitovaných pacientů (*Wheeler, 2003*). *S. cerevisiae* je slabý patogen, ale u pacientů s oslabeným imunitním systémem (AIDS, nádorová bujení, myelodisplastický syndrom, popáleniny, revmatoidní artritida, …) může způsobit invazivní oportunní onemocnění (*Anaissie et al., 2003*). Exprese virulentních vlastností a patogenního potenciálu je závislá na mnoha faktorech a daném kmeni *S. cerevisiae* (*Anoop, et al., 2015*). Byla zkoumána virulence u kmenů *S. cerevisiae* z klinických izolátů, kmenů z ovoce a laboratorních kmenů pomocí myších modelů. Tyto zkoušky prokázaly, že virulentní kmeny z klinického materiálu neobsahovaly gen ssd1 a měl schopnost růst při vyšších teplotách (41°C). Gen ssd1 je odpovědný za změny tvaru a složení buněčné stěny. Pokud je tento gen potlačen, dochází k nárůstu virulence a tvorbě prozánětlivých cytokinů. V důsledku toho dochází k prozánětlivé odpovědi a septickému šoku (*Wheeler, 2003*).

Výskyt mykózy může být spojován také s operacemi či invazivními procedurami, užíváním širokospektrých antibiotik a přítomnost centrálního žilního katetru (*Anaissie et al. 2003*). Příkladem výskytu mykózy je případ 58 - letého muže s anamnézou

hypertenze, hyperlipidémie a aterosklerózy po aortálním štěpu. Pacient se dostavil s obtížemi. Byly mu odebrány dvě sady aerobních a anaerobních hemokultur, z kterých byly po osmi dnech kultivace izolovány kvasinky. Tyto kvasinky byly dourčeny dle jejich fenotypových vlastností pomocí komerčních setů (API 20C AUX) a askospor jako *Saccharomyces*. Identifikace *S. cerevisiae* byla potvrzena sekvenční analýzou genu 18S rRNA (*Smith, 2002*).

Dalším příkladem patogeneze je osteomyelitida způsobená *S. cerevisiae* u 39 - leté ženy pekařky, která utrpěla distální zlomeninu pažní kosti po zachycení do elektrického míchače na těsto, bez zjevné imunodeficience po traumatu. Je to vůbec první popsaný případ infekce u imunokompetentního pacienta. Zlomenina byla vyčištěna a chirurgicky ošetřena a byl orálně podán ampicilin (3g/den). Bakteriální kultury z hlubokých chirurgických ran byly pozitivní na *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter cloacae*. Pacientka tak byla intenzivně léčena imipenemem (1000mg/12h) a ciprofloxacinem (500mg/8h). I přesto, se pátnáctý den hospitalizace objevil hnisavý výtok z rány na paži. Chirurgická biopsie kosti prokázala přítomnost *S. cerevisiae*. Po chirurgickém vyčištění rány, byla podávána perorální antimykotika s vorikonazolem v kombinaci s hyperbarickou kyslíkovou terapií. Infekce kloubů a kostí způsobené touto kvasinkou jsou extrémně vzácné. Jsou známy pouze dva případy infekce kostí způsobené *S. cerevisiae* a to u pacientů po chemoterapii a tedy s oslabenou obranyschopností. Prvním případem je 73 – letá žena s revamtoiní artritidou a Sjögrenovým syndromem a druhý je čelistní osteomyelitida u 4 – letého chlapce (*Seng, et al., 2016*).

Při stanovení patogenity by měla být brána v potaz schopnost *S. cerevisiae* růst při 42°C, pH růstu, sekrece fosfolipázy nebo tvorba biofirmu. Vliv na propuknutí infekce má také složitá interakce hostitel – patogen na systémové úrovni. Stanovení patogenního potenciálu vyžaduje kombinaci fenotypových a genotypových metod pro odlišení od známých patogenních kmenů. Podobně tomu tak je u stanovení virulence *in vivo* a *in vitro* (*Anoop, 2015*).

Standardní léčba lokální nebo systémové mykózy je orálními azoly. Ale všeobecně rozšířená terapie při vzniku infekce je parenterální podání amfotericinu B (*Anaissie et al., 2003*).

S. cerevisiae hraje důležitou roli i v prospěchu zdraví. Díky svým vnitřním nutričním hodnotám a biofunkčním vlastnostem se hojně využívá jako probiotikum při léčbě např. rakoviny slinivky břišní, popálenin nebo selhání ledvin. Z těchto výrobků byly izolovány kmeny *S. cerevisiae* subkmen *Boulardii.* Studie však prokázaly, že užívání těchto doplňků stravy s obsahem 10^7 a 10^8 *S. cerevisiae* na gram výrobku mohou u predisponovaných jedinců vyvolat infekci (*Llopis, 2014*).

Jsou popsány i studie o využití *S. cerevisiae* jako terapeutického přípravku při léčbě kandidóz. Kvasinka *Candida albicans* (*C. albicans*) je nejběžnějším patogenem, který způsobuje vulvovaginální kandidózu (VVC). Kandidóza postihuje až 75 % žen v plodném věku, které jsou jinak zdravé. Propuknutí VVC může být spojenou s užíváním antibakteriálních preparátů, které narušují přirozenou vaginální mikroflóru. Tím je umožněno *C. albicans* přerůstat a propuknou tak symptomy choroby. Pericolini a jeho kolegové zjistili účinek kvasinky *S. cerevisiae* na myším modelu. Po podání živé či inaktivované *S. cerevisiae* se zvýší clearence *C. albicans*. Zajímavé je, že jednorázové podání živých *S. cerevisiae* buněk vyvolá účinek na kandidu srovnatelný s léčbou běžně používaného antimykotického léku flukonazolu. Kvasinky mezi sebou soupeří a agregují a tak dochází k inhibici adheze *C. albicans* k vaginálním epitelovým buňkám. *S. cerevisiae* jsou schopny fyzicky rušit *C. albicans* kolonizaci epitelu, ale také přímo inhibují zpracování několika klíčových faktorů patogenity a virulence *C. albicans* (*Wilson, 2016*).

Protilátky proti *S. cerevisiae* (ASCA) hrají důležitou roli jako diagnostické markery u idiopatických střevních zánětů. ASCA společně s protilátkami proti porinu C vnější membráně *Escherichia coli* (anti-OMPC) jsou detekovatelné v séru pacientů s Crohnovou chorobou (*Bertin, 2013*).

6 *S. CEREVISIAE* A JEJÍ VYUŽITÍ

Kvasinka *S. cerevisiae* byla společníkem a pomocníkem člověka už před 5000 lety. Je jednou z neprostudovanějších a nejpoužívanějších kvasinek, díky snadnému a ekonomicky výhodnému pěstování na levných kultivačních médiích a krátkému generačnímu času (2 hodiny) (*Ruml, 2002*).

6.1 Modelový organismus

Modelové organismy jsou využívány pro výzkum, protože poskytují formu, na níž lze vyvinout a optimalizovat metody, které usnadňují a sjednocují analýzu. Modelové organismy slouží jako zástupci např. člověka. *S. cerevisiae* je nejvíce používaným modelovým organismem. Byla použita například jako model pro studium stárnutí, regulace genové exprese, přenos signálu, buněčný cyklus, metabolismus, apoptózu, neurodegenerativních poruch a mnoha dalších biologických procesů (*Karathia, 2011*).

6.2 Produkce rekombinantních proteinů

Exprese rekombinantních proteinů umožňuje získání velkého množství specifického produktu v krátkém čase z velmi malého množství kultivačního objemu. *S. cerevisiae* se jako první využívala pro produkci rekombinantních proteinů. Velkou výhodou kvasinek je možnost je pěstovat jak v haploidní podobě tak v diploidní. Je možné tyto dvě formy kvasinek křížit a získat tak hybridní potomstvo s genetickou výbavou obou rodičovských buněk. Sporulace haploidních buněk a jejich analýza nám poskytuje materiál ke studiu rekombinací a genových konverzí. V kvasinkách probíhá řada mechanismů vedoucích k posttranslačním úpravám podobným jako u buněk vyšších eukaryot. Řada kvasinkových mutantů nám poskytuje možnost studia vlivu enzymů a buněčných faktorů na osud exprimovaných faktorů. V genovém inženýrství jsou komerčně dostupné kvasinkové systémy používané pro expresi genu. Pro izolaci, amplifikaci a expresi klonované DNA se využívají plasmidové vektory. Existují dva hlavní typy kvasinkových vektorů. Prvním typem jsou kvasničné integrační plasmidy (YIp = Yeast Integrative plasmid), které nejsou schopny autonomní replikace a pro přežití vyžadují integraci do chromozomu hostitelské buňky. Druhým typem jsou kvasničné replikační plasmidy (YRp = Yeast Replicating plasmid), které jsou v kvasinkách schopny autonomní replikace (*Ruml, 2002*).

6.3 Potravinářství

Kvasinka *S. cerevisiae* se díky své schopností zkvašovat tedy fermentovat glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu a rafinózu využívá v pivovarnictví vinařství, lihovarnictví a v neposlední řadě i v pekařství (*Görner a Valík, 2004*).

6.3.1 Pivní kvasinky

Pivo je nápoj s dávnou historií, přesto byla souvislost mezi kvasinkami a kvašeným procesem prokázána teprve v 19. století. Kvasinky ovlivňují chemické složení piva a jeho trvanlivost (*Bendová a Kahler, 1981*). Kmeny pivovarských kvasinek můžeme z technologického hlediska rozdělit na dva typy. Spodní pivovarské kvasinky *S. cerevisiae* (*carlsbergensis*), popř. (*uvarum*) se v poslední fázi kvašení mladiny shlukují a usazují jako sediment na dně kvasné nádoby. Využívají se při výrobě piva typu ležák. Kvasí při nízkých teplotách (6 – 8°C). Svrchní typ kvasinek *S. cerevisiae* naopak kvasí při teplotách vyšších okolo 25°C a používá se pro výrobu piva typu Ale. Během kvašení jsou svrchní kvasinky vynášeny na hladinu mladiny za tvorby husté pěny tzv. deky. V pivovarnictví se dají využívat i metody genového inženýrství pro přípravu technologicky upravených kmenů pivních kvasinek. Genetické manipulace slibují vylepšení genofondu kvasinek a získání kvasničných kmenů s technologicky významnými vlastnostmi například pro urychlení zrání piva, zlepšení filtrovatelnosti piva (*Basařová, 2010*).

***Tabulka č. 4**: Možnosti zlepšení pivních kvasinek vnesením nových genů nebo ovlivněním produkce kvasničných enzymů (přejato z Basařová, 2010, upraveno)*

Druh enzymů	**Využití**
	Zvýšení aktivity
Glykolytické enzymy	Rychlejší kvašení, hrubší prokvašování, výroba dia-piva
Proteolytické enzymy	Zvýšení koloidní stability piva
Enzymy řídící flokulaci	Snazší separace kvasnic
Glukanázy	Zlepšení filtrovatelnosti
Reduktázy biacetylu	Snížení obsahu biacetylu
Reduktázy	Zlepšení chuti, vůně a stability piva
	Snížení aktivity
Glykolytické enzymy	Nealkoholické pivo
Proteolytické enzymy	Zvýšení pěnivosti

6.3.2 Vinné kvasinky

Mezi vinařské kvasinky patří *Saccharomyces cerevisiae* var. e*llipsoideus, S. oviformis* je tzv. „dokvášecí“ a je tolerantnější k alkoholu. Další je *S. beticus*, která produkuje buketní látky. K buketu vína také přispívá autolýzy kvasinek. V závislosti na vinařské oblasti je kvasinková mikroflóra na hroznech jiná. Liší se nejen v oblastech od sebe vzdálených, ale i v rámci vinic jednoho regionu. Kvasinky se do moštu dostávají buď z povrchu hroznů, zde hovoříme o spontánním kvašení, nebo se do moštu přidávají čisté kultury ušlechtilých kvasinek a pak jde o čistou fermentaci (*Penhisi, 2005*). Substrátem pro růst kvasinek a tvorbu konečných metabolických produktů, které jsou vyloučeny do vína, je šťáva z hroznů. Mezi hlavní produkty patří oxid uhličitý a etanol. Méně zastoupené produkty jsou pak glycerol a kyselina jantarová. Kromě toho kvasinky při fermentaci produkují v malé míře těkavé kyseliny, širokou škálu organických kyselin vyšších alkoholů, esterů, aldehydů, ketonů a sloučenin síry a aminů. Všechny tyto látky společně dotvářejí výsledné aroma a chuť vína (*Doyle, et al. 2001*).

6.3.3 Pekařské kvasinky

Pekařské droždí připravujeme pomocí aerobní fermentace okyselených melasových zápar s přídavkem amonných solí a fosfátu. Pro rychlejší množení kvasinek v kvasných tancích se zápary provzdušňují sterilním stlačeným vzduchem a přítok melasové zápary také zajišťuje aerobní metabolismus. Výhodou je pomnožení kvasinek za snížené koncentrace cukru. I přesto však pekařské kvasinky tvoří malé množství etanolu, který vzniká částečnou hexózovou represí dýchání (*Šílhánková, 2002*).

6.3.4 Lihovarské kvasinky

V lihovarském průmyslu se využívají pro produkci lihu různé druhy vyšlechtěných kvasinek *S. cerevisiae*. Kvašení v tomto případě probíhá za velmi rozmanitých podmínek a tak jsou od kvasinek vyžadovány různorodé vlastnosti např. vysoká tolerance k etanolu a teplotě (až 30°C), vysoká rychlost fermentace do 48 hodin a v neposlední řadě vysoký výtěžek na jednotku spotřebovaného substrátu. I různé substráty (melasa, bramborová zcukřená zápara, sulfinový výluh, dřevný hydrolyzát,…) vyžadují různorodost kvasinek (*Kokcová, 1961*). Například kvasinky k výrobě whisky jsou kříženci *S. cerevisiae*

a *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, které činností glukoamylózy hydrolyzují a fermentují maltotetrázy a nízkomolekulární maltodextriny (*Walker, 1998*).

7 DISKUSE A ZÁVĚR

S. cervisiae je značně rozšířeným druhem kvasinky, jejíž prospěšnosti se využívalo již před 5000 lety. Je to kvasinka s rozmanitým využitím jak v potravinářském průmyslu, tak i ve výzkumu a genetice. V oblasti potravinářského průmyslu se uplatňuje převážně v pivovarnictví, vinařství a lihovarnictví hlavně pro její kvasný proces a schopnost tvořit etanol a v neposlední řadě má velké uplatnění v pekařství.

První část této práce seznamuje s mikroorganismem jako takovým. Je zde popsána morfologie, chemické složení, biochemické vlastnosti i metabolismus této kvasinky jako eukaryotické buňky. V druhé části jsou uvedeny obecné laboratorní podmínky pro kultivaci kvasinek a jejich diagnostiku pomocí biochemických vlastností, jako je fermentace a asimilace např. cukrů a nebo dusíkatých látek. V dnešní době využívá spousta laboratoří i modernější techniku a pro identifikaci kvasinek lze použit i daleko přesnějších sofistikovanějších moderních metod jako jsou metody molekulární biologie (např. PCR) nebo hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS).

Samostatnou kapitola je věnována patogenezi této kvasinky. I přes všechny kladné vlastnosti *S. cervisiae*, které vedou k jejímu širokému využití v průmyslu, se může pro člověka stát patogenní. A to zejména pro osoby se sníženou imunitou, např. pro onkologické pacienty, pacienty s popáleninami, po závažné operaci nebo po nějakém invazivním výkonu. Příkladem je v této práci uveden případ muže, u kterého se po operaci aortální chlopně rozvinula mykotická sepse. Při provedené hemokultivaci byl identifikován původce sepse jako *S. cerevisiae* (*Smith, 2002*). Vyskytl se i případ onemocnění osteomyelitidou způsobené touto kvasinkou u pacientky pracující v pekařství (*Seng, et al., 2016*).. Na druhou stranu má tato kvasinka i pozitivní vliv na organismus. Využívá se například jako probiotikum při léčbě popálenin nebo u selhání ledvin. Dále je zdokumentován případ užití *S. cervisiae* při mykotickém onemocnění ženských pohlavních orgánů *C. albicans.* Bylo zjištěno, že podání živých buněk *S. cervisiae* má obdobný účinek jako užití antimykotického léku flukonazol (*Wilson, 2016*)..

Dále tato kvasinka slouží jako jeden z nejvíce používaných modelový organismů. Jelikož je velmi podrobně popsán celý genom této kvasinky, lze ho využít například pro studium

stárnutí, regulace genové exprese, přenosu signálu, buněčného cyklu, metabolismu a dalších jiných procesů v buňce.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK:

Obr. 1 Eukaryotická buňka 11

obr. 2 Buňky *Saccharomyces cerevisiae* v DIC mikroskopu 17

Obr. 3 Barvení dle Gramma 18

Obr. 4 Kolonie *Saccharomyces cerevisiae* na Sabouraudově agaru 20

Obr. 5 AuxaColor 2 22

Obr. 6 Schéma PCR 23

Tab. 1 Skupiny a význam látek v kvasničné buňce 14

Tab. 2 Fermentace 16

Tab. 3 Růst 16

Tab. 4 Možnosti zlepšení pivních kvasinek vnesením nových genů nebo 27

9 Literatura

ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, c1998, s. 26-27. ISBN 80-902-9062-0.

ANAISSIE, Elias J, Michael R MCGINNIS a Michael A PFALLER. *Clinical mycology*. New York: Churchill Livingstone, c2003, xii, 608 p. ISBN 04-430-7937-4.

ANOOP, Valar, Sever ROTARU, Philip S. SHWED, Azam F. TAYABALI, George ARVANITAKIS a Jens NIELSEN. Review of current methods for characterizing virulence and pathogenicity potential of industrial Saccharomyces cerevisiae strains towards humans.*FEMS Yeast Research* [online]. 2015, **15**(6), fov057- [cit. 2016-09-04]. DOI: 10.1093/femsyr/fov057. ISSN 1567-1364. Dostupné z: http://femsyr.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/femsyr/fov057

BASAŘOVÁ, Gabriela, Jan ŠAVEL, Petr BASAŘ a Tomáš LEJSEK. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.

BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. První. Praha: Marvil, 1996.

BENDOVÁ, Olga a Miroslav KAHLER. *Pivovarské kvasinky*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1981.

BERTIN, Daniel, Jean-Charles GRIMAUD, Nathalie LESAVRE, Chahine BENELMOULOUD, Ariadne DESJEUX, Stéphane GARCIA, Sophie DESPLAT-JÉGO a Valli DE RE. Targeting Tissular Immune Response Improves Diagnostic Performance of Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies (ASCA) in Crohn's Disease. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(11), e80433- [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1371/journal.pone.0080433. ISSN 1932-6203. Dostupné z: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0080433

DOYLE, Michael P., Larry R. BEUCHAT a Thomas J. MONTVILLE. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2001. ISBN 15-558-1208-2.

FEDERHEN, Scott. The NCBI taxonomy database. *Nucleic acids research*, 2012, 40.D1: D136-D143. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi

FRAGNER, Petr. *Mykologie pro lékaře*. 1. vyd. Praha: SZdN, 1967.

GÖRNER, Fridrich. a Ľubomír. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatín*. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967-0649-7.

HAMAL Petr, JANDOVÁ Božena. *Identifikace kvasinek z klinického materiálu. Přehled současných možností se zaměřením na fenotypové metody a komerční produkty. Postgraduální medicína [online] 5.11.2010, příloha 5/2010* Dostupné z: http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/identifikacekvasinek-z-klinickeho-materialu-prehled-soucasnych-moznosti-sezamerenim-na-fenotypove-metody-a-komercni-produkty-455847 ISSN 1214-7664

HOOG, G. *Atlas of clinical fungi*. 2nd ed. Utrecht: Centraalbureau Schimmelcultures, c2000, viii, 1126 s., čb. obr. ISBN 90-703-5143-9.

KOPECKÁ, Jana. *Kvasinky a jejich využití* [online]. Brno, 2009 [cit. 2016-04-09]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/223187/prif_b/Bak_Jana_hotovo.pdf. Vedoucí práce Doc. RNDr. Miroslav Němec CSc.

KARATHIA, Hiren, Ester VILAPRINYO, Albert SORRIBAS, Rui ALVES a Gonzalo DE POLAVIEJA. Saccharomyces cerevisiae as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE* [online]. 2011-2-2, **6**(2), e16015- [cit. 2016-05-18]. DOI: 10.1371/journal.pone.0016015. ISSN 1932-6203. Dostupné z: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0016015

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. a Marta. KUTKOVÁ. *Atlas kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů*. [Vyd. 1]. Praha: Státní nakl. technické literatury, 1961.

KURTZMAN, C a Jack W FELL. *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, c2000, s. 358-9. ISBN 04-448-1312-8.

LLOPIS, Silvia, Carolina HERNÁNDEZ-HARO, Lucía MONTEOLIVA, Amparo QUEROL, María MOLINA, María T. FERNÁNDEZ-ESPINAR a Joy STURTEVANT. *Pathogenic Potential of Saccharomyces Strains Isolated from Dietary Supplements. PLoS ONE* [online]. 2014-5-30, 9(5), e98094- [cit. 2016-05-16]. DOI: 10.1371/journal.pone.0098094. ISSN 1932-6203. Dostupné z: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0098094

MELTER, Oto a Annika MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2414-3.

MIKRO-LA-TEST katalog [online]. Brno [cit. 2016-05-14]. Dostupné z: https://www.erbalachema.com/attachments/MLT_katalog_CZ.pdf

MINÁRIK, Erich. *Chémia a mikrobiológia vína*. Bratislava: Príroda, 1986.

PODSTATOVÁ, Hana. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium*. 1. vyd. Olomouc: Epava, 2001. ISBN 80-862-9707-1.

RUML, Tomáš. *Genové inženýrství*. Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 80-708-0499-8.

SENG, Piseth, Alexandre CERLIER, Carole CASSAGNE, Mathieu COULANGE, Regis LEGRÉ a Andreas STEIN. Saccharomyces cerevisiae osteomyelitis in an immunocompetent baker.*IDCases* [online]. 2016, **5**, 1-3 [cit. 2016-09-04]. DOI: 10.1016/j.idcr.2016.05.002. ISSN 22142509. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214250916300294

SMITH, D., D. METZGAR, C. WILLS a J. FIERER. Fatal Saccharomyces cerevisiae Aortic Graft Infection.*Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2002, 40(7), 2691-2692 [cit. 2016-05-16]. DOI: 10.1128/JCM.40.7.2691-2692.2002. ISSN 0095-1137. Dostupné z: http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.40.7.2691-2692.2002¨

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potraviná̊ře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.

ŠKODOVÁ, Anna. *Identifikace kvasinek rodu Saccharomyces z listů, bobulí a moštů révy vinné* [online]. Brno, 2008 [cit. 2016-04-09]. Dostupné z: file:///C:/Users/Petra/Desktop/Downloads/diplomova%20prace%20Anna%20Skodova.pdf. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Mgr. Dana Vránová Ph.D.

ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.

VONDREJS, Vladimír a Zuzana STORCHOVÁ. *Genové inženýrství I*. Praha 1, Ovocný trh 5: Karolinum, 1997. ISBN 382-110-97.

VOTAVA, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno, 2000. ISBN 80-238-5058-X.

WALKER, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. New York: J. Wiley, c1998. ISBN 04-719-6446-8.

WHEELER, R. T., M. KUPIEC, P. MAGNELLI, C. ABEIJON a G. R. FINK. A Saccharomyces cerevisiae mutant with increased virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2003, 100(5), 2766-2770 [cit. 2016-05-16]. DOI: 10.1073/pnas.0437995100. ISSN 0027-8424. Dostupné z: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0437995100

WILSON, Duncan. A tale of two yeasts: Saccharomyces cerevisiae as a therapeutic against candidiasis. *Virulence* [online]. 2016, , 00-00 [cit. 2016-09-04]. DOI: 10.1080/21505594.2016.1230580. ISSN 2150-5594. Dostupné z: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2016.1230580

ZDEŇKOVÁ, Michaela. *Identifikace kvasinek rodu Saccharomyces během kvašení bílého vína* [online]. Brno, 2008 [cit. 2016-04-09]. Dostupné z:

https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/12955/Diplomov%C3%A1%20pr%C3%A1ce-%20Michaela%20Zde%C5%88kov%C3%A1.pdf?sequence=1. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Mgr. Dana Vránová Ph.D.