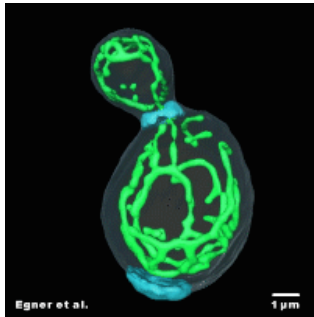
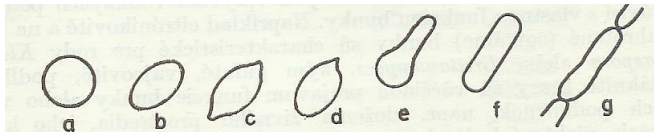


Kvasinky



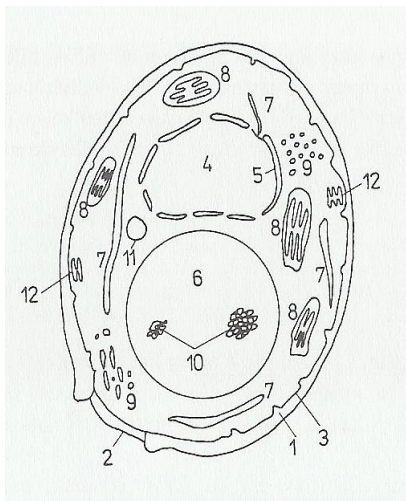
- Zařazení do systému
 - Eukaryotní mikroorganismy
 - Heterotrofní, většinou jednobuněčné, aerobní nebo fakultativně anaerobní
 - Velikost buňky 3 – 15 μm, rotační elipsoid až vláknitý tvar
 - Patří mezi houby (*Fungi*)
 - vegetativní rozmnožování - pučení a dělení
 - podle pohlavního rozmnožování je dělíme na:
 - Askomycety
 - Bazidiomycety
- Známo je asi 700 druhů kvasinek

Tvar buňky kvasinek



- a - sférický
- b - elipsoidní
- c - citronkový
- d - ogivální
- e - lahvovitý
- f - podlouhý
- g - vláknitý

Buňka kvasinek



1. Buněčná stěna
2. Zárodečná jizva
3. Cytoplazmatická membrána
4. Jádro
5. Jaderná membrána
6. Vakuola
7. Endoplazmatické retikulum
8. Mitochondrie
9. Glykogen
10. Polymetafosfát (volutin)
11. Lipid
12. Golgiho aparát

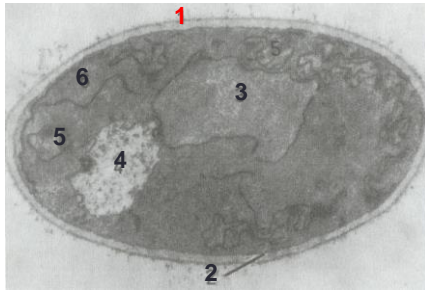
Buňka kvasinek – chemické složení

- Voda 65 – 80 %
- Dusíkaté látky 45 – 60 %
- Cukry 15 – 37 %
- Lipidy 2 – 12 %
- Minerální látky 6 – 12 % (P_2O_5 , Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn)
- Růstové látky, vitamíny skupiny B, vitamín C atd.
- Charakteristické bílkoviny kvasinek:
cerezivin (typický kvasinkový albumin), zymokasein (fosfoprotein) a glutatiol

Buňka kvasinek – chemické složení

- **Sacharidy** – sacharidy buněčné stěny (glukan a manan) + sacharidy cytoplazmy (glykogen a manan)
- **Nukleové kyseliny** – jsou obsaženy v jádru a mitochondriích
- **Lipidy** – převaha vázaných tuků v buněčných strukturách nebo tuky volné v cytoplazmě ve formě kapének
- Složené tuky (fosfolipidy a glykolipidy):
Fosfolipid **lecitin** a **kefalin** – uplatnění pro metabolismu tuků
Lecitin reguluje propustnost BS

Buňka kvasinek



1 - buněčná stěna

2 - cytoplazmatická membrána

3 - jádro

4 - vakuola

5 - mitochondrie

6 - endoplazmatické retikulum

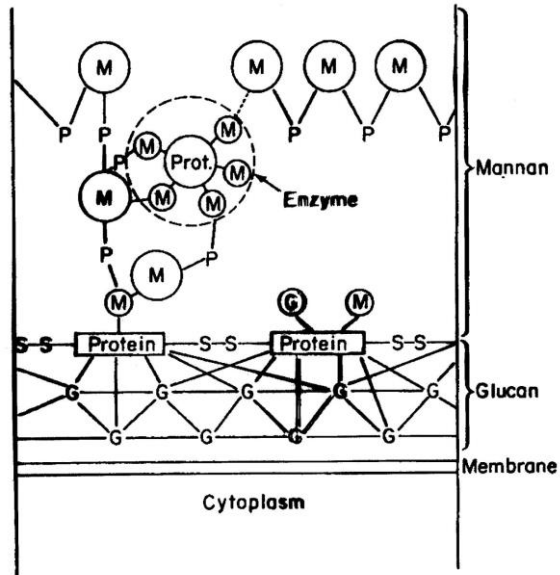
Buněčná stěna

- Síla 25 nm, 25 % sušiny buňky
- Základní složky: glukán, manan, protein, lipid, chitin, fosfát
- Polysacharidy (80 % sušiny stěny) - struktura vláken tvořících hustou síť
- *Bílkoviny strukturní* (6 – 10 % sušiny stěny) - tvoří výplň síť, převaha aminokyselin kys. asparagová a glutamová
- *Bílkoviny s enzymatickou aktivitou* – invertáza, kyselá fosfatáza, lipáza, glukonáza, manáza
- Lipidy a fosfolipidy (do 5 % sušiny stěny) - výskyt nepravidelný
- Fosforečnany - diesterové vazby mezi polysacharidy
- Chitin – polymer N-acetyl-D-glukozaminu, výskyt v místě jizev

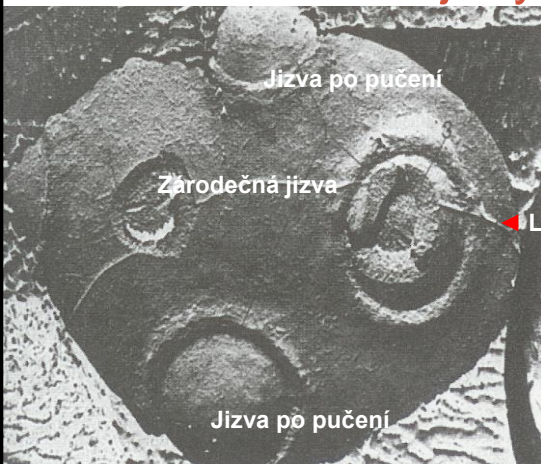
Struktura buněčné stěny kvasinek

Detailní struktura není dosud známa.

3 vrstvy: glukan, manan, mezi nimi matrix tvořená komplexy manan-protein vázané mezi sebou disulfidickými můstky



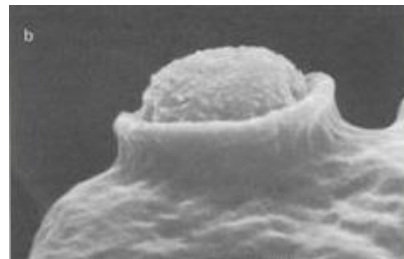
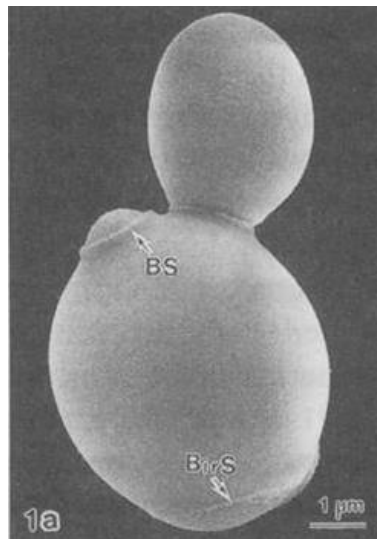
Buněčná stěna - jizvy



Jizvy – glukozamin, chitin

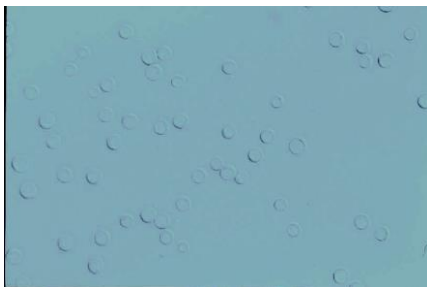
Počet jizev mezi 23 a 43 na buňku, v místě jizev není aktivní povrch, u starších buněk je proto omezena metabolická aktivita

Kvasinkový pupen a jizva po pučení

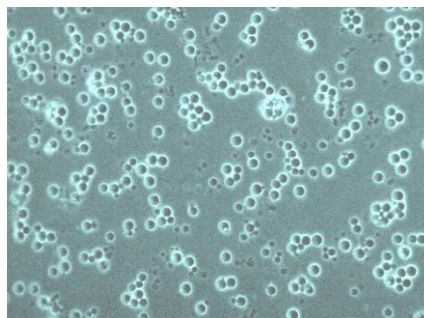


Obrázek: ESM (electron scan microscopy)

Buněčná stěna - protoplasty



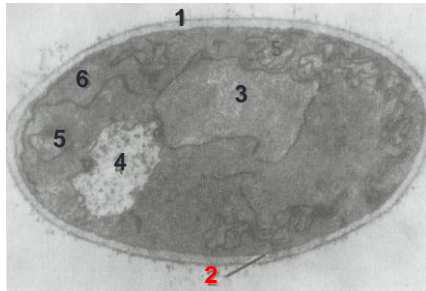
Protoplast →
Helix pomatia - snail enzym
„šnekáza“ (helikáza)



Protoplasty – využití u nesporulujících kvasinek pro křížení – fúze protoplastů. Je možná reverze na nativní buňku (polyetylglykol + ionty vápníku)

Pokud není buněčná stěna zcela odstraněna, vznikají **sferoplasty**, je možná regenerace

Buňka kvasinek



1 - buněčná stěna

2 - cytoplazmatická membrána

3 - jádro

4 - vakuola

5 - mitochondrie

6 - endoplazmatické retikulum

Cytoplazmatická membrána

- Plazmalema, plazmatická membrána
- Klasická dvojvrstevná membrána
- Tloušťka 7,5 - 8 nm, mozaiková struktura
- **Není** sídlem enzymů oxidativní fosforylace (sídlem oxidoredukčních enzymů je vnitřní membrána mitochondrie)
- Velmi časté invaginace tvaru měchýřků a tubul
- **Funkce CM:**
 1. Tvoří elastický obal a bariéru na povrchu buňky
 2. Zodpovědná za transport látek (aktivní, pasivní, zprostředkovaná difúze) a osmoregulaci
 3. Je místem syntézy některých komponent buněčné stěny a "obalových polysacharidů"

Jádro



- 1-buněčná stěna
- 2-cytoplazmatická membrána
- 3-jádro
- 4-vakuola
- 5-mitochondrie
- 6-endoplazmatické retikulum

- Dvojitá **jaderná membrána (karyolema)** s velkými póry, mezi vrstvami membrány je tzv. **perinukleární prostor, diferenciace polárního tělíska**
- Umístěno přibližně ve středu buňky
- Počet chromozomů 16
(u *S.cerevisiae*)
- V karyoplazmě diploidních buněk je také kruhová DNA ►

Jadérko (nukleolus) + karyoplazma

V nukleoplazmě jsou **plazmidy**:
plazmid 2µm – počet kopií 60 až 100

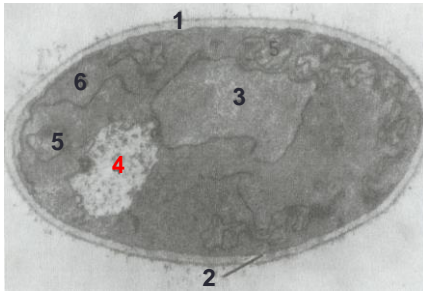
Jádro – chromatin

- Skládá se z nukleozomálních **histonů**
 - H2A , H2B – podobné některé úseky s jinými eukaryoty
 - H3 – u kvasinek je odlišný
 - H4 – podobný jako u vyšších eukaryot

Tento tetramerní útvar tvoří dřeň jádra, je obalen DNA, tvoří **nukleozom**

Dělení jádra – při vegetativním množení – mitózou, při pohlavním množení (vzniku pohlavních spor) meiózou –
výsledek: 4 haploidní jádra (4 haploidní spory)

Vakuola



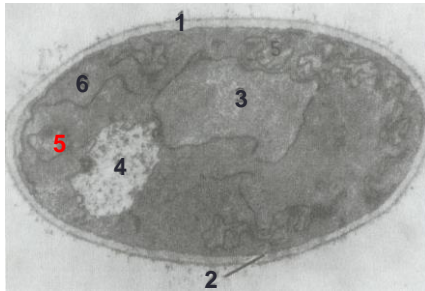
- 1-buněčná stěna
- 2-cytoplazmatická membrána
- 3-jádro
- 4-vakuola
- 5-mitochondrie
- 6-endoplazmatické retikulum

- Nejnápadnější složka buňky, až 90 % prostoru
- Sférický útvar obdaný jednoduchou membránou (**tonoplastem**)
- Často vysílá výběžky do cytoplazmy
- U starších buněk obvykle jedna velká vakuola (může vyplňovat většinu prostoru)
- Rozpad vakuoly před a fúze po dělení buňky

Vakuola

- Obsahuje hydrolytické enzymy (proteinázy, esterázy, ribonukleázu)
- Má tedy podobnou funkci jako lyzozomy vyšších eukaryot
- Obsahuje polyfosfáty (volutin), velkou zásobu volných aminokyselin, purinů, bílkoviny a tuky
- Ve formě krystalků zde může být také hromaděna kyselina močová a izoguanin
- Podíl na udržování intracelulárního pH

Mitochondrie



- 1-buněčná stěna
- 2-cytoplazmatická membrána
- 3-jádro
- 4-vakuola
- 5-mitochondrie
- 6-endoplazmatické retikulum

- Jsou různého tvaru (kulovité, válcovité, laločnaté, ..)
- Velikost ► šířka 0,3 - 1,0 μm , délka 1 - 3 μm
- **2 membrány** – **vnitřní a vnější**
 - vnější část vnitřní m. – enzymy glykolýzy
 - vnitřní část vnitřní m. – enzymy Krebsova cyklu, ATPáza
- Obsahují vlastní, mitochondriální, DNA (cirkulární) – **mtDNA**
- **Dělení je nezávislé na dělení buňky**
- Mitochondriální ribozomy (mitoribozomy) – **mt-ribozomy 76S – sedimentační konstanta**
- Počet závisí na metabolické aktivitě

Mitochondrie

- **Respiračně deficientní mutanti**

Při potlačení respirace nebo po mutaci

Zdrojem energie zůstává pouze fermentace

Malé kolonie, tzv. petit kolonie

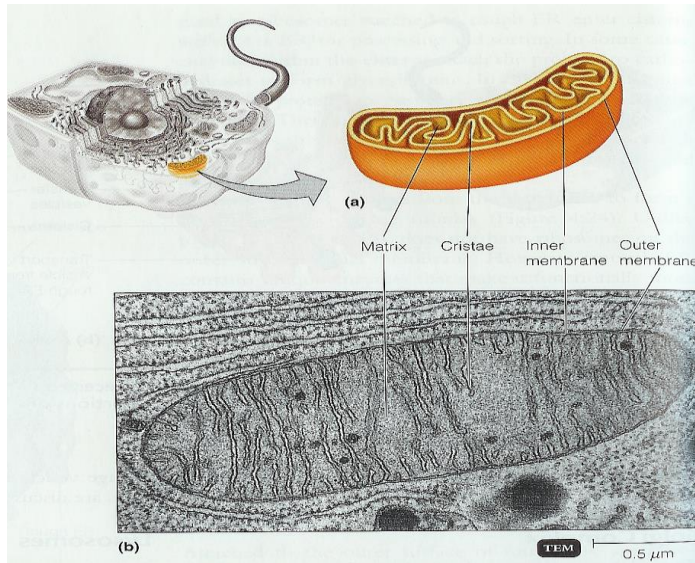
- **Promitochondrie**

Mitochondrie změněné vlivem vnějšího prostředí

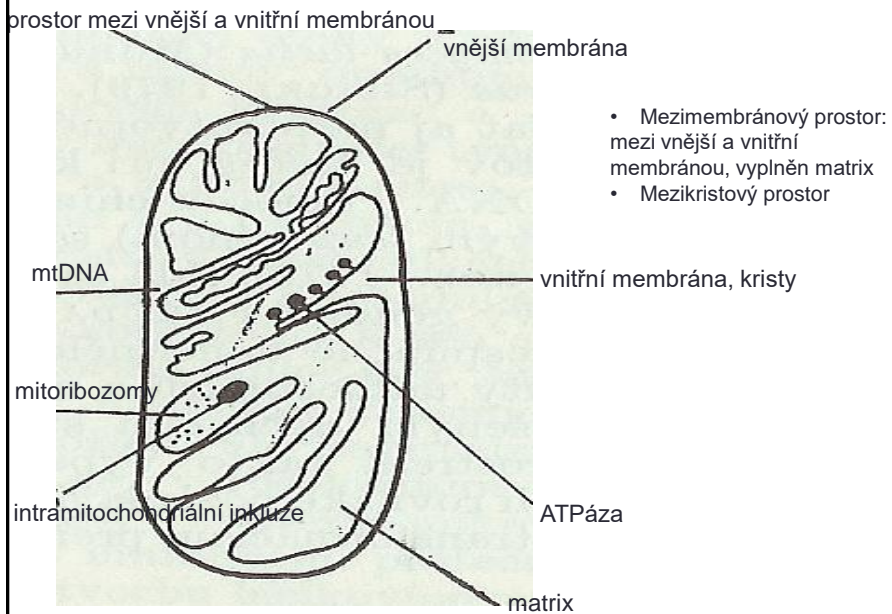
Morfologicky jednodušší, omezená metabolická aktivita

Reverzibilní stav – po odeznění faktoru, který změnu vyvolal, nastane plný návrat do původního stavu

Mitochondrie



Mitochondrie



Endoplazmatické retikulum

Podobné ER vyšších rostlin a živočichů
Je místem **syntézy proteinů**

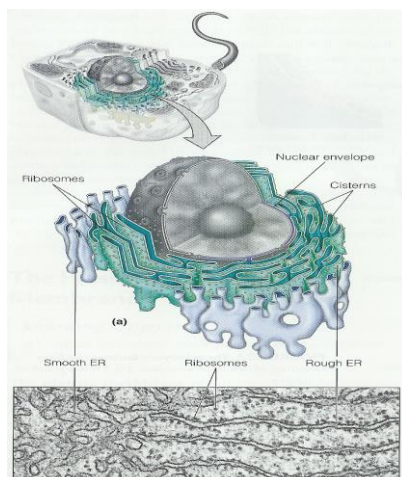
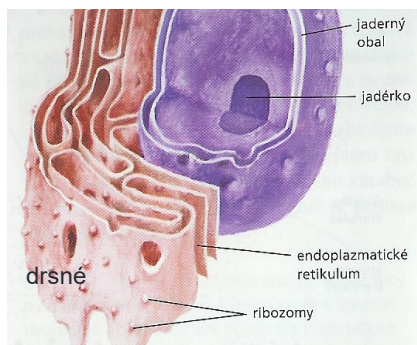


- 1-buněčná stěna
- 2-cytoplazmatická membrána
- 3-jádro
- 4-vakuola
- 5-mitochondrie

6-endoplazmatické retikulum

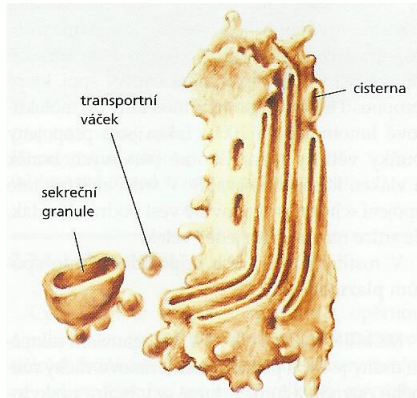
- Vytváří cisterny, lamely, tubuly, ..
- Skládá se ze dvou membrán (vnější a vnitřní)
- Mezi nimi **echylema**, ve které jsou globulární tělíska
- Obvykle je spojeno s plazmalemou nebo s jadernou membránou
- Obě membrány jsou asymetrické
- Na vnější membránu jsou vázány ribozomy
- Hladké a drsné ER s ribozomy
- Proteiny – posttranslační úpravy a transport na místo určené sekrečními membránovými měchýřky

Endoplazmatické retikulum



Golgiho komplex

Popsán pouze u eukaryot



- U kvasinek může a nemusí být přítomen (jeho funkci může převzít ER)
- Obvykle je tvořen jedním nebo více **diktyozomy**
- U kvasinek existuje Golgiho aparát **jen** ve formě jednotlivých diktyozomů – cisteren, z jejichž obou konců se uvolňují měchýřky
- Počet diktyozomů je závislý na aktivitě buňky
- Předpokládá se úzký vztah s dělením buňky
- Funkčně navazuje na endoplazmatické retikulum, upravuje jeho produkty, zajišťuje jejich transport

Cytoskelet

- Je to síť proteinových vláken
- Jsou přítomné v základní cytoplazmě i v jádře
- Umožňuje vnitrobuněčný pohyb organel
- Přítomnost **mikrotubulů** ► málo ohebné trubice složené z bílkovinných podjednotek ► **tubulin**, přítomen je také **aktin**
- Každá molekula tubulinu obsahuje **guanozintrifosfát**
- Mikrotubuly vycházejí z určitého centra a konce jsou rozkládány nebo obnovovány podle potřeby

Cytoskelet - mikrotubuly

- Mikrotubuly uskutečňují pohyb organel prostřednictvím tzv. **mechanoenzymů**, např. myozinů
- Pohyb se děje za spotřeby ATP
- **Myoziny** – jsou zodpovědné za tvorbu primárního septa, pohyb jádra, mitochondrií,
- **Kineziny** a **dyneiny** se uplatňují při fúzi jader a při dělení jader
- Kineziny umožňují pohyb od mikrotubulárních center, dyneiny k centřům

Cytosol (cytoplazma)

- Protoplast po odstranění buněčných organel ► cytosol, cytoplazma
- Koloidní stav – přítomnost bílkovin, glykogenu a jiných rozpuštěných makromolekulárních a nízkomolekulárních látek
- pH 6,2 – 6,4
- Diferenciační centrifugací se získají mikrotělíska
 - mikrozomy
 - peroxizomy
 - glyoxizomy

Ribozomy

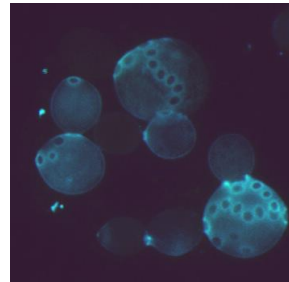
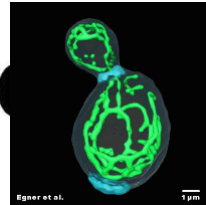
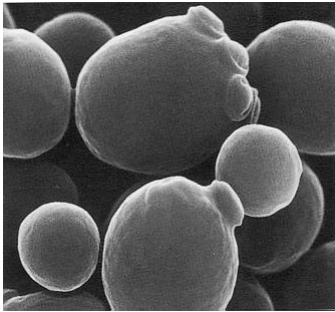
- Sférické organely o velikosti 20 – 30 nm
- Sedimentační koeficient 70 – 80S
- 80S může disociovat na 40S a 60S podjednotky
- 60S - 5S rRNA, 5,8S rRNA, 28S rRNA + 40 různých bílkovin)
- 40S – 18S rRNA + 30 různých bílkovin
- Ribozomy mohou být volné nebo vázané na ER
- Počet v závislosti na fyziologickém stavu buňky, složení vnějšího prostředí a rychlosti růstu

Rozmnožování kvasinek

- Vegetativní
 - pučení
 - příčné dělení
- Pohlavní – spájení:
 - izogamní
 - heterogamní

Pučení

- **multilaterální** (*Saccharomyces cerevisiae*)
- **bipolární**



Pučení

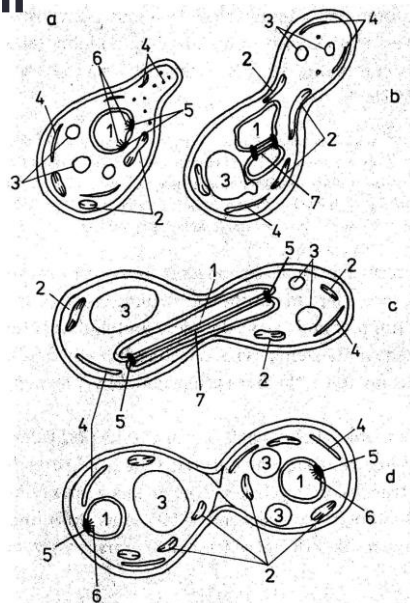
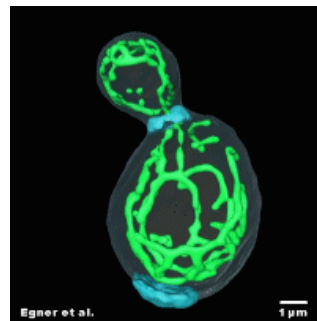


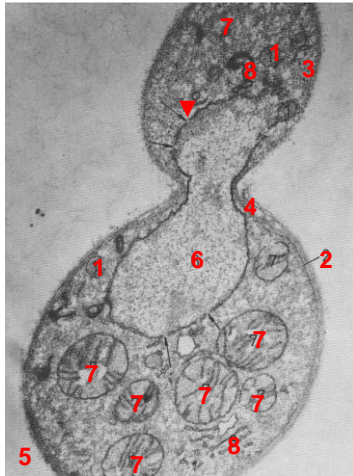
Schéma pučící buňky

1. Jádro (mitóza)
2. Mitochondrie
3. Vakuola
4. Endoplazmatické retikulum
5. Pólové tělíčko vřeténka
6. Mikrotubuly
7. Vřeténko

Proces trvá
cca 2 h



Pučení

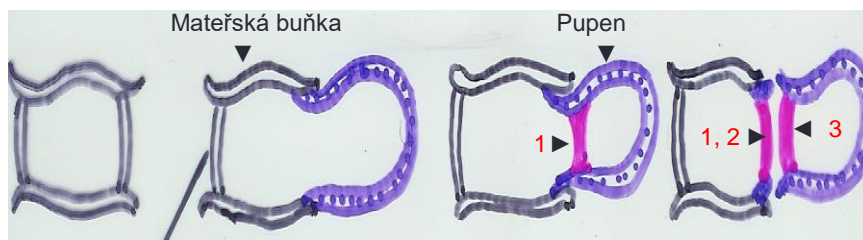


Řez pučící buňkou *Rhodotorula glutinis*

1. Vakuola
2. Cytoplazmatická membrána
3. Cytoplazma
4. Lom stěny
5. Jizva po předchozím pučení
6. Jádro
7. Mitochondrie
8. Endoplazmatické retikulum

▼ Póry v jaderné membráně

Pučení - bipolární



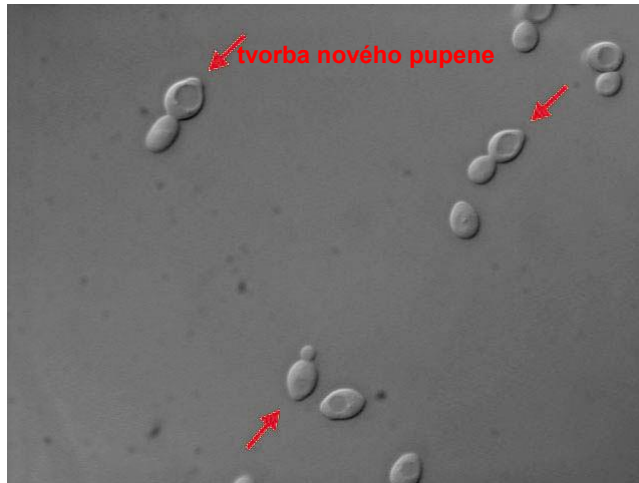
Zárodečná jizva

1 - primordium

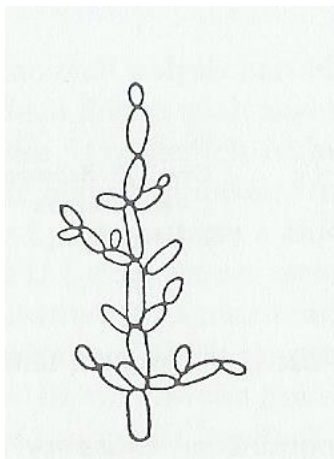
2 – mateřská jizva

3 – zárodečná jizva

Pučení - bipolární



Pučení - bipolární



- U některých druhů s protáhlými buňkami se pupeny neoddělují a vytváří se tzv. **pseudomycelium** (bez centrálního póru)
- V určitých místech pseudomycelia vznikají svazky kratších elipsoidních buněk - **blastospory**
- Např. *Aureobasidium pullulans*

Vegetativní spory

- **Blastokonidie**

Na stranách nebo na konci hyf
Elipsoidní, okrouhlé nebo protáhlé

- **Artrokonidie**

Vznik rozpadem hyf, válečkovité
Např. *Trichosporon*, *Endomyces*, *Geotrichum*

- **Chlamydospory**

Vznik na koncích hyf, interkalárně nebo volně v prostředí
Velké silnostěnné buňky, obsah zásobních látek – bílkovin a lipidů, také pigmentů
Vznik za nepříznivých podmínek prostředí
Např. *Candida albicans*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida pulcherina*

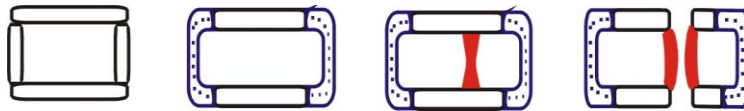
Rozmnožování kvasinek

- Vegetativní
 - pučení
 - příčné dělení
- Pohlavní – spájení:
 - izogamní
 - heterogamní

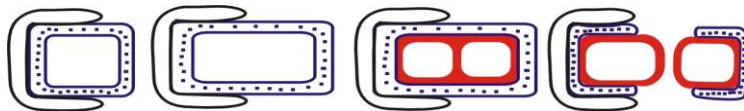
Příčné dělení

zřídka - např. rod *Schizosaccharomyces*

Příčné dělení 1 (po dělení jsou buňky jednotlivé)



Příčné dělení 2 (vede ke vzniku mycelia nebo pseudomycelia)



Příčné dělení – tvorba mycelia

Mycelium



Pseudomycelium



● - centrální pór

▲ - tvorba přepážky (septa)

Rozmnožování kvasinek

- Vegetativní
 - pučení
 - přehrádečné dělení
- **Pohlavní** – spájení:
 - izogamní
 - heterogamní

Rozmnožování kvasinek - pohlavní

- Pohlavní **endospory** (askospory)
- Pohlavní **exospory** (sporidie) – jen u dvou rodů
- **Proces pohlavního rozmnožování:**
 - Spájení dvou n buněk a jader – vznik $2n$ zygoty
 - Redukční dělení $2n$ jádra meiózou – $4n$ jádra – $4n$ pohlavní spory

Rozmnožování kvasinek - pohlavní

- **Izogamní spájení** – spájení dvou stejně velkých buněk, např. rod *Saccharomyces*
- **Heterogamní spájení** – spájení dvou nesejně velkých buněk nebo mateřské buňky s pupenem (*Debaromyces*)
- **Homotalické kmeny** – kmen má buňky **jednoho** párovacího typu α nebo **a**
- **Heterotalické kmeny** – kmen má buňky opačného párovacího typu α i **a** (+, - ; h^+ , h^-) – většina kvasinek

V přítomnosti buněk α i **a** fúzí vzniká zygota α/a

Specifický **feromon** řídí celý proces, naruší BS pro aglutinaci buněk obou párovacích typů.

Rozmnožování kvasinek - pohlavní

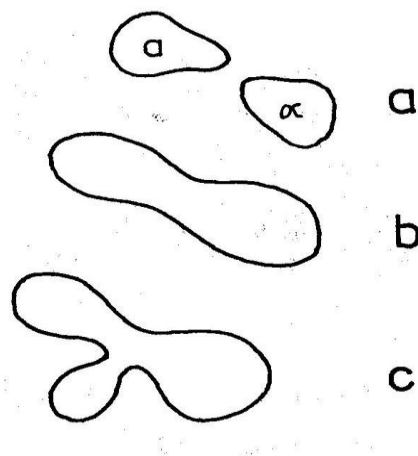
- Párovací typ kvasinek je dědičný a je determinován geny MAT (***mat α*** pro buňky typu α , nebo ***mat a*** pro buňky typu **a**)
- Lokus MAT je lokalizován na **chromozomu III**
- Lokus MAT **kontroluje také proces sporulace**
- Lokus MAT je zodpovědný za produkci specifického peptidu – “feromonu“
- Lokus MAT je velmi stabilní. Měnit s může jen mutací $a \rightarrow \alpha$, nebo $\alpha \rightarrow a$

Rozmnožování kvasinek - pohlavní

- Funkce “feromonu“
 - **zastavuje** buněčný cyklus v uzlovém kontrolním bodě fáze G1
 - **mění** náboj povrchu buněk opačného párovacího typu (možnost aglutinace)
 - “**změkčuje**“ stěny buněk opačného párovacího typu
 - buňky mění tvar

Rozmnožování kvasinek - pohlavní

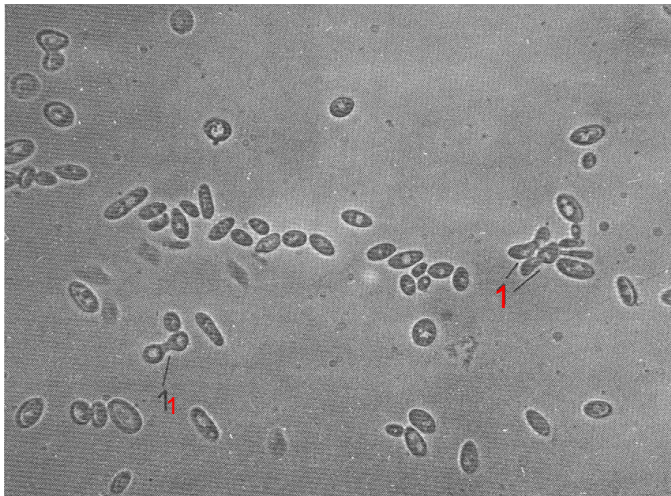
Izogamní spájení



- a – změna tvaru buňky
- b – vznik **zygoty**
- c – pučení zygoty

Rozmnožování kvasinek - pohlavní

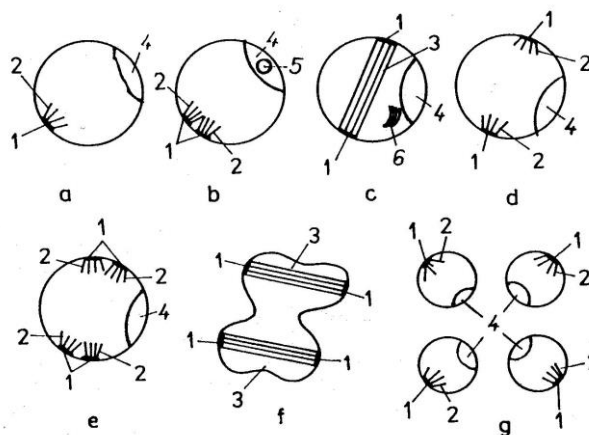
Izogamní spájení



1 - zygota

Rozmnožování kvasinek - pohlavní

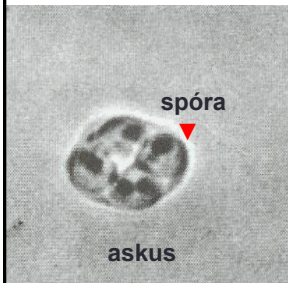
Jednotlivé fáze meiózy u *Saccharomyces cerevisiae*



- a – diploidní jádro
- b – rozdělení pólového tělíska
- c – vytvoření vřeténka
- d – rozpad vřeténka
- e – rozdělení obou pólových tělísek
- f – vytvoření dvou vřetének
- g – rozpad vřetének a vytvoření čtyř haploidních jader

1 – pólové tělísko, 2 – mikrotubuly, 3 – vřeténko, 4 – jadérko, 5 – kulovité tělísko, 6 – polykomplexní tělísko

Rozmnožování kvasinek - pohlavní



Saccharomyces cerevisiae

$\alpha \times a \rightarrow$

dikaryot \rightarrow

zygota \rightarrow

4 haploidní spory



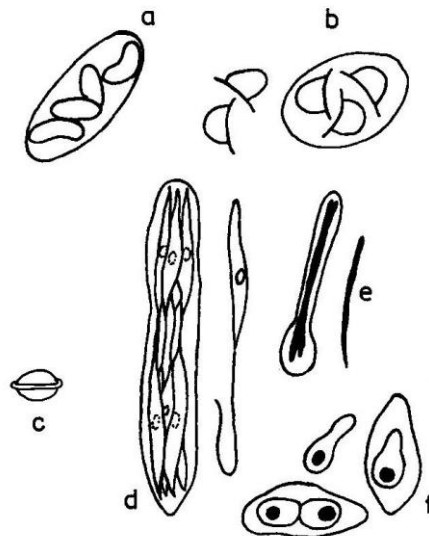
Celá buňka se mění ve vřecko

Pokud při meióze dojde k nepravdělnosti nebo některé z jader zanikne, je počet spor v asku menší

Rozmnožování kvasinek - pohlavní

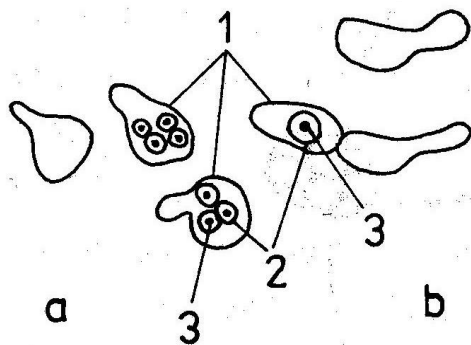
Tvar askospor u kvasinek

- a – ledvinovitý
(*Kluyveromyces marxianus*
ar. marxianus)
- b – kloboukovitý
(*Hansenula anomala*)
- c – saturnovitý
(*H. saturnus*)
- d – vřetenovitý
(*Nematospora coryli*)
- e – jehlovitý
(*Metschnikowia plucherrima*)
- f – tvaru čepice
(*Wickerhamia fluorescens*)



Rozmnožování kvasinek - pohlavní

Heterogamní spájení a tvorba asků



a – *Debaryomyces*

b – *Nadsonia*

1 – askus

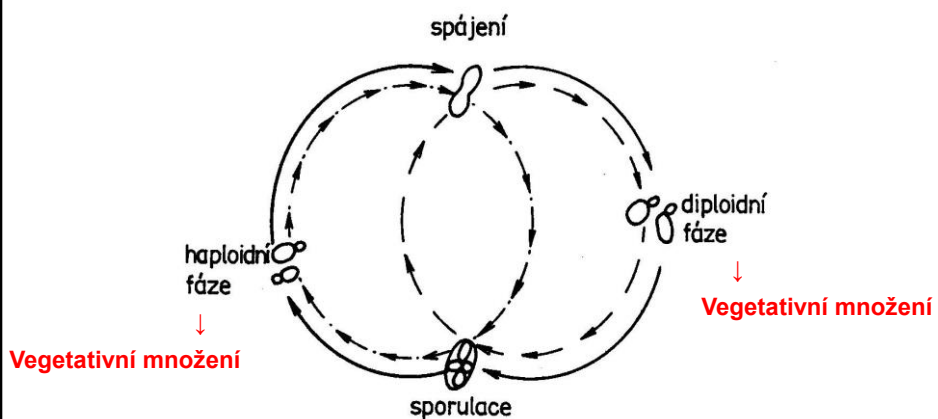
2 – askospory

3 – tuk

Ke spájení může dojít i mezi matefskou buňkou a pupenem

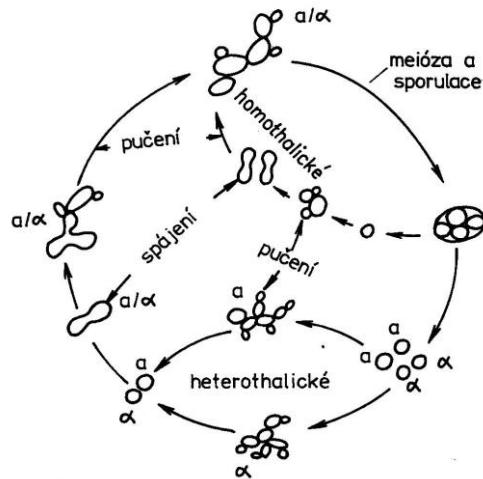
Životní cyklus kvasinek

- Střídání haploidní a diploidní fáze



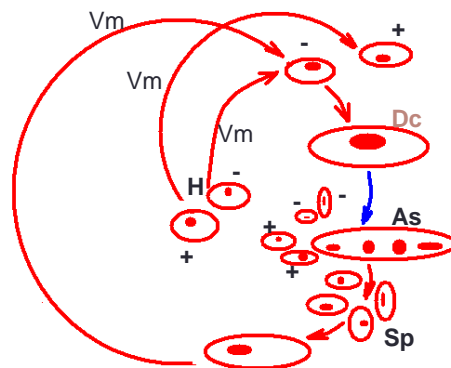
Životní cyklus *Saccharomyces cerevisiae*

Kmeny homotalické i heterotalické
Nejčastěji se vyskytují v **diploidní fázi**



Životní cyklus *Schizosaccharomyces pombe*

Rozmnožuje se příčným dělením (nepučí)



Nejčastěji se vyskytují v **haploidní fázi**

H – haploidní buňka
Dc – diploidní buňka (jen zygota!!)

Vm – vegetativní množení

As - askus

Sp - spory

→ **haploidní fáze**

→ **diploidní fáze**

Askus s 1 – 8 askosporami

Pohlavní množení:

izogamní konjugace

Podobná velikost

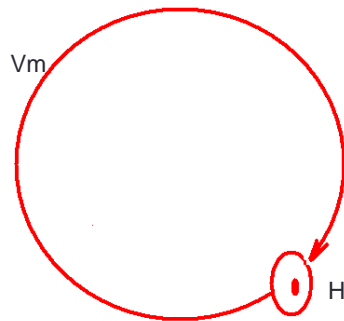
genetické informace jako

S. cerevisiae, ale jen

3 chromozomy,

v genech časté **introny**

Životní cyklus *Torulopsis* sp.



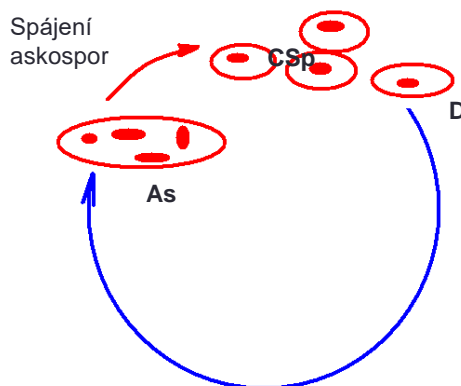
H – haploidní buňka

Vm – vegetativní množení

→ výhradně haploidní fáze

Např. *Torulopsis*, *Candida*,
Rhodotorula aj.

Životní cyklus *Saccharomyces ludvigii*



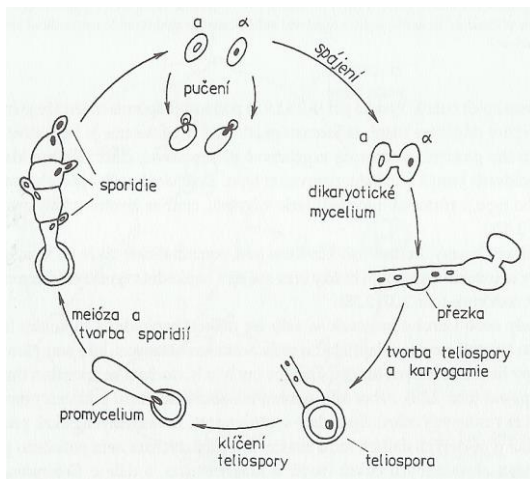
As - askus

D - dikaryot

CSp – spájení spory

Ke spájení askospor dochází přímo ve vřecku
Haploidní fáze neexistuje vůbec!!!

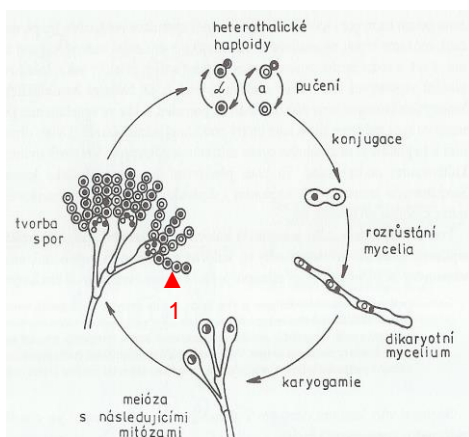
Životní cyklus u rodu *Leucosporidium*



Vytváří
**pohlavní exospory -
sporidie**

Pučením sporidie vzniká
haploidní
vegetativní buňka

Životní cyklus rodu *Filobasidiella*



teleomorfa kvasinky
Cryptococcus

Vytváří
**pohlavní exospory -
bazidiospory**

1 na polokulovitém konci
bazidie vzniká
8 přisedlých bazidiospor

Využití kvasinek

Pivovarské kmeny kvasinek:

Kmeny spodního kvašení: kvašení probíhá při teplotách pod 10°C, po dobu asi 7 dnů, **etanoltolerance nemusí být vysoká**, po skončeném kvašení kvasinky sedimentují



Kmeny svrchního kvašení: kvašení probíhá kratší dobu při teplotách 20°C a kvasinky jsou na konci vynášeny na povrch tekutiny



Využití kvasinek

Vinařské kmeny kvasinek

Je požadována **střední etanoltolerance**, kvašení probíhá při 25°C po dobu 7-14 dnů (obsah etanolu při porovnání s lihovarskou výrobou roste pomalu). Je požadována i **odolnost k SO₂**, kterým se ošetřuje vinný mošt, po skončení kvašení je žádoucí autolýza kvasinek, neboť přispívá k vytváření buketu vína. U kmenů pro výrobu šampaňských vín je nutná odolnost až k 8 – 12 % etanolu od počátku kvašení.

U kmenů pro výrobu tokajských vín je nutná odolnost ke zvýšenému osmotickému tlaku.



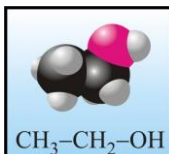
Využití kvasinek

Lihovarské kmeny kvasinek

Požadována je **vysoká odolnost k etanolu**, neboť kvašení probíhá pouze po dobu 24 – 48 h, během nichž obsah etanolu roste rychle až k 11 % (**vysoká rychlost fermentace**)

Vhodná je i **osmotolerance**, která umožňuje využití koncentrovanějších melas.

Kvasinky na rozdíl od pivovarských nemají schopnost aglutinovat a sedimentovat



Využití kvasinek



Pekařské kmeny

Cílem je získání co největší biomasy, požaduje se proto **rychlé množení a co nejmenší sklon k alkoholovému kvašení**, protože zdroj C a energie má být maximálně využit k tvorbě biomasy. Kultivace probíhá za **aerobních podmínek** a uplatňuje se hlavně respirace. Kvasinky nesmí aglutinovat, mají minimálně adsorbovat barviva (vzhled kvasinek a nemají mít sklon k autolýze (trvanlivost droždí)