

RNDr. VLADIMÍR JIRKŮ, CSc., Prof. Ing. GABRIELA BASAŘOVÁ, DrSc., Vysoká škola chemicko-technologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha

Současné informace o stavbě a složení stěny kvasinkové buňky byly získány metodami fyzikálně chemickými, biochemickými a cytologickými. Vývoj těchto poznatků byl přirozeně spojen s vývojem metod izolace čisté buněčné stěny, tedy stěny kompletně izolované do komponentů a struktur vnitřního prostředí buňky. Převážně starší studie byly vypracovány se stěnami buněk rodu *Saccharomyces*. Novější práce tyto poznatky jednak rozšiřují, jednak věnují pozornost stěnám buněk jiných kvasinkových rodů.

V těchto souvislostech následující přehled shrnuje informace o biochemii, architektuře a funkci buněčných stěn zmíněného typu. V jednotlivých kapitolách je pozornost věnována především základním komponentům stěny a jejich úloze. Z hlediska stavby a složení buněčné stěny jsou rovněž shrnuty informace o její biodegradaci.

## 1. Vývoj poznatků a metod studia

První informace o složkách povrchových struktur kvasinkové buňky byly získány v rámci obecného studia jejího chemického složení [1], které vycházelo z analýzy nerozpustných zbytků po alkalické hydrolýze a extrakci

buněk. Je pochopitelné, že hlavní komplikací interpretace těchto výsledků byla otázka, které z identifikovaných složek jsou skutečně součástí buněčné stěny, nebo jen kontaminací intracelulárního původu. Řešení tohoto problému bylo umožněno až aplikací diferenciální centrifugace [2]. V této souvislosti vznikla otázka, co jednotliví autoři skutečně považují za izolovanou buněčnou stěnu. Sjednocení názorů bylo dosaženo až cytologickou diferenciací buněčné stěny a cytoplazmatické membrány. Teprve získání spolehlivých preparátů buněčné stěny umožnilo tedy rozhodnout, který z biopolymerů izolovaných alkalickou extrakcí je specifickou součástí buněčné stěny. Dvě významné práce ze začátku 50. let se shodly v závěru, že preparáty stěny kvasinkové buňky obsahují přibližně stejná množství glukanu a mananu, a to kromě lipidů a bílkovin [3, 4]. Zároveň bylo zjištěno, že stěna kvasinkových buněk jiných rodů než *Saccharomyces* obsahuje uvedené složky v jiném koncentračním zastoupení nebo obsahuje některé další komponenty [5]. Ze specifických složek byl v této době předmětem zájmu především chitin [6].

Vývoj v metodické oblasti postupně přinesl tyto mož-



nosti. Extrakcí v silně alkalickém prostředí bylo možno selektivně odstranit manan a bílkoviny (popřípadě rozpustný  $\alpha$ - nebo  $\beta$ -glukan). Extrakcí do horké kyseliny octové byl odstraněn rozpustný glukan, který je směsí glykogenu a  $\beta$ -1,6-glukanu. Extrakcí do kyseliny chlorovodíkové byl odstraněn chitin. Touto cestou byl získán tzv. kvasinkový glukan, který je ovšem heterogenní z hlediska typu  $\beta$ -glukozidové vazby [7]. Strukturní variabilita této vazby je stále jedním z hlavních problémů vlastní analýzy, ve které chemické a fyzikálně chemické metody nejsou často vhodné nebo dostatečně specifické. V této souvislosti značně přispěla enzymová analýza, umožněná izolací čisté endo- $\beta$ -1,3- a endo- $\beta$ -1,6-glukanázy [8]. Pomocí těchto enzymů bylo možno provést kontrolovanou degradaci izolovaného glukanu a přibližně stanovit počet  $\beta$ -1,3- a  $\beta$ -1,6-glukozidových vazeb. Některé rozdíly ve výsledcích, získaných enzymovou digescí glukanu téhož kvasinkového kmene, zároveň ukázaly na vliv podmínek, za kterých enzymová degradace probíhá, vliv způsobu izolace glukanu a především vliv faktorů, které ovlivňují stavbu a složení kvasinkové buněčné stěny [7, 9, 10].

## 2. Struktura glukanu

Původní analýzy glukanu pomocí metylace [30. a 40. léta] vedly k představě lineárního polyméru glukózy, ve kterém jsou jednotlivé molekuly navzájem spojeny  $\beta$ -1,3-glukozidovou vazbou [11]. V následujícím desetiletí se ukázalo, že tento předpoklad neodpovídá zcela skutečnosti. Lepší separační metody pro metylované deriváty glukózy ukázaly, že 2,4,6-trimethylglukóza není jediným produktem metylace a degradace glukanu [12]. Vzniklé podrobnější představy předpokládaly, že glukan je tvořen kratšími řetězci, ve kterých existuje  $\beta$ -1,3-glukozidová vazba a které jsou vzájemně propojeny  $\beta$ -1,6-vazbou [13]. Jiní autoři v této souvislosti navrhli místo vazby  $\beta$ -1,6-vazbu  $\beta$ -1,2- [12]. Další variantou byla představa větvené struktury řetězce s vazbou  $\beta$ -1,6-, ke které jsou připsány řetězce s vazbou  $\beta$ -1,3- [14]. Tyto rozdílné představy se pokusili sjednotit *Manners* a *Patterson*, kteří výsledky své podrobné analýzy shrnuli v předpoklad, že hlavní řetězce obsahují výhradně  $\beta$ -1,6-vazby a v postranních řetězcích jsou glukozové zbytky spojeny vazbou  $\beta$ -1,3- [9]. Tito autoři však o několik let později dospěli k opačným závěrům, které si v hrubých rysech zachovaly svoji platnost dodnes [15]. Podle této představy buněčné stěny kvasinek kmene *Saccharomyces cerevisiae* obsahují nerozpustný heterogenní glukan, který se přibližně z 85 % skládá z nerozpustného větveného  $\beta$ -1,3-glukanu a z 15 % z rozpustného větveného  $\beta$ -1,6-glukanu. Studie buněčných stěn jiných kmenů prokázaly, že obsah  $\beta$ -1,6-glukanu může být větší. Tyto informace jsou nyní rozšířeny o zjištění, že stěna buněk kmene *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje glukan, který je rozpustný v silně alkalickém prostředí. Tento glukan, který byl získán jako gel neutralizací alkalických extraktů izolovaných stěn, je homogenní a neobsahuje žádné výraznější kontaminace ostatních stěnových polysacharidů. Strukturní analýza ukázala na přítomnost  $\beta$ -1,3- (80–85 %) a  $\beta$ -1,6-vazeb (3–4 %). Jeho molekulová hmotnost je přibližně 250 000 [7].

Glukan, který je rozpustný v silně alkalickém prostředí, byl rovněž zjištěn ve stěnách buněk jiných kvasinkových rodů [16]. Enzymová analýza a fyzikálně chemické studie však ukázaly, že tento glukan obsahuje vazbu  $\alpha$ -1,3. Jeho zastoupení v buněčných stěnách je pravděpodobně závislé na složení kultivačního média [28]. Tento polysacharid, který je nevětvený a obsahuje výhradně  $\alpha$ -1,3-glukopyranosylové jednotky, je jinak dosti rozšířen ve stěnách buněk vyšších hub a stěnách mycelia imperfektních hub.

Z hlediska prostorového uspořádání je lineární  $\beta$ -1,3-glukan základem mikrofibril, které uspořádány do svazků tvoří glukanový skelet [17, 18]. Studium resyntézy buněčné stěny u protoplastů prokázalo, že biosyntéza této fibrilární sítě je nezávislá na proteosyntéze, avšak podmíněna přítomností glukózy [18].

## 3. Struktura mananu

Manan byl poprvé izolován precipitací alkalického extraktu buněčné stěny Fehlingovým roztokem. Po rozpuštění precipitátu v kyselině chlorovodíkové byl manan vysrážen alkoholem [19]. Tato metoda je přes některé modifikace používána dodnes. Metylační analýzy prvních vzorků již ukázaly, že jde o vysoce větvený polymer manózy s přítomností  $\alpha$ -glukozidových vazeb typu  $\alpha$ -1,6-,  $\alpha$ -1,2- a  $\alpha$ -1,3- [19, 20]. Podle původní představy byl „páteří“ celé struktury mananu polymer s  $\alpha$ -1,2- vazbou. Pozdější názor, potvrzený enzymovou analýzou, předpokládal v hlavním řetězci vazbu  $\alpha$ -1,6- a v postranních řetězcích vazbu  $\alpha$ -1,2- [21].

Studium struktury mananu, v taxonomické závislosti ukázalo na některé další rozdíly. V této souvislosti lze uvést změny v množství nesubstituovaných manózových zbytků v hlavních řetězcích [22], relativní zkrácení postranních řetězců nebo zjištění krátkých úseků, ve kterých jsou manózové zbytky v hlavním řetězci spojeny  $\alpha$ -1,3-vazbou [23]. Některé výsledky ukázaly na to, že přítomná manóza se může vyskytovat na furanózové konfiguraci [24]. Manan izolovaný z buněk kmenů *Kloeckera brevis* a *Kloeckera apiculata* obsahuje v postranních řetězcích malé množství  $\alpha$ -1,3-vazeb [22]. Zajímavým výsledkem je i preparát mananu, který v postranních řetězcích obsahuje  $\alpha$ - i  $\beta$ -vazby [25]. Poznání variability struktury mananu umožnilo formulovat čtyři tzv. chemotypy mananu [26]. Možnost definovat strukturu mananu tímto způsobem je podmíněna skutečností, že struktura mananu (na rozdíl od glukanu) je poměrně konstantní a nezávislá na fyziologických faktorech.

Práce věnované struktuře mananu rovněž ilustrují poměrně širokou škálu experimentálních přístupů. Starší metody acetalolýzy a methylační analýzy jsou kombinovány s moderními analytickými metodami. Řada důležitých informací byla rovněž získána enzymovou analýzou [21, 25, 27].

Zvláštní pozornost zasluhují i stabilní modifikace mananu. Izolace manózo-6-fosfátu [28] potvrdila starší předpoklad, že fosfor je integrální součástí mananu [29]. Informace, které jsou k dispozici, ukazují, že tato hladina fosforu je značně variabilní, a to nejen mezi jednotlivými druhy, ale i v rámci téhož druhu. Růstové podmínky, způsob izolace stěny a mananu i aktivita fosfatasy jsou zřejmě faktory, které ovlivňují celkovou koncentraci fosfomananu [28, 29]. Úloha fosforu není známa. Vzhledem ke zjištění, že přítomnost fosforu inhibuje aktivitu exo- $\alpha$ -monoizidáz [30], lze předpokládat, že prostorová nebo jiná interference tohoto druhu hraje určitou úlohu v regulaci autodegradačních procesů stěny.

Další přirozenou modifikací mananu je galaktomanan, jehož přítomnost je prokázána u řady kvasinkových kmenů [31]. Poměr manózy a galaktózy je ve struktuře mananu variabilní a lokalizace galaktózy je otevřenou otázkou. Podobně jako v případě fosfomananu lze z hlediska funkce tohoto komponentu předpokládat určitou úlohu v regulaci autodegradačních procesů. Kvasinková buněčná stěna může však obsahovat i další heteropolysacharidy — arabomanan, xylomanan, fukomanan.

Koncem 50. let se předpokládalo, že sérologické rozdíly kvasinkových buněk jsou podmíněny rozdíly v povrchových strukturách. Důkaz, že imunodominantní strukturou je manan, byl však získán mnohem později [32].



Vývoj v tomto směru byl umožněn jednak zjištěním, že manan je hlavním antigenem kvasinkových buněk, jednak důkazem, že produkty jeho degradace jsou potenciálními hapteny, které mohou interferovat v reakci antigenu s protilátkou. Tato skutečnost umožnila identifikovat v mananech izolovaných z buněk různých kmenů specifické imunodominantní struktury [33]. Za důležitou složku kvasinkového antigenu byla označena manozylfosfatová skupina. Imunologické vlastnosti mananu byly především sledovány u kmenů *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera brevis*, *Saccharomyces lactis* a patogenního kmene *Candida albicans* [34]. V současné době předstává imunochemie kvasinkové buněčné stěny perspektivní směr, jehož poznatky jsou především významné z hlediska teoretického (studium architektury buněčné stěny), lékařského (identifikace serotypů patogenních kmenů) a taxonomického (detekce kmenů, detekce kontaminace průmyslových kultur).

#### 4. Chitin

Tento komponent patří k prvním, které byly identifikovány v kvasinkové buněčné stěně [35]. Jeho přítomnost je nyní prokázána ve stěnách několika desítek taxonomicky vzdálených kmenů.

Chitin je nevětvěný polymer N-acetyl-D-glukóзамinu s  $\beta$ -1,4-glukozidovou vazbou, který je především lokalizován v oblasti jizvy vznikající oddělením dceřiných buněk. Kromě tohoto druhu chitinu, který je označován za nerozpustný, je některými autory předpokládána přítomnost chitinu, který je v určitých podmínkách rozpustný, a to pravděpodobně následkem nižšího stupně polymerizace [36]. U některých druhů bylo prokázáno, že přes vysoký obsah chitinu není tento komponent lokalizován v oblasti jizvy [37]. Variabilita v obsahu chitinu často souvisí s variabilitou v morfolonii buňky a kultivačních podmínkách. Přesná představa o úloze chitinu neexistuje. Vzhledem k lokalizaci tohoto komponentu je však pravděpodobná přímá nebo nepřímá úloha v procesu buněčného dělení.

#### 5. Bílkovinná a lipidová složka

Přesné stanovení celkové hladiny bílkovin v kvasinkové buněčné stěně bylo rovněž závislé na vývoji metod přípravy stěnových preparátů. První údaje v tomto směru byly přirozeně zkresleny cytoplazmatickými kontaminacemi a byly tedy v průměru vyšší. Pozdější studie ukázaly, že obsah stěnových bílkovin se pohybuje přibližně v rozsahu 5–7 %. Již z těchto studií vyplynul závěr, že existují mezidruhové rozdíly a rozdíly podmíněné kultivačními podmínkami. V těchto souvislostech bylo především zájmu i zastoupení jednotlivých aminokyselin. Izolace bílkovin byla v tomto případě provedena jako izolace polysacharidu, který je v komplexu s bílkovinou. Výsledek kvalitativní analýzy ukázal poměrně široké zastoupení jednotlivých druhů aminokyselin (10–17 %). Kvantitativní analýza pak ukázala na vyšší koncentrace hydroxydikarbonových kyselin.

Ve studiu otázky stěnových bílkovin je možno rozlišit dvě základní hlediska, a to hledisko chemické (popř. fyzikálně chemické) a hledisko enzymové aktivity. V prvním případě byla pozornost soustředěna na otázku vazby mezi polysacharidem a bílkovinou a otázku velikosti a homogenity obou složek. Předmětem studia byly manan-bílkovinné komplexy nebo tzv. glukomanan-bílkovinné komplexy, které pravděpodobně obsahují rozpustný glukán. Uvedené komplexy obsahují glukozamín, kterému je přisuzována funkce vazebné složky mezi mananem a bílkovinou [36, 44].

Z hlediska enzymové aktivity buněčné stěny byla prokázána především přítomnost hydroláz. Experimentální komplikací je vždy důkaz, zda zjištěný enzym je skutečně bílkovinnou složkou stěny. Chybný názor je obvykle

le důsledkem nedostatečné separace buněčné stěny a cytoplasmatické membrány. Enzymy, jejichž lokalizace v buněčné stěně je prokázána, jsou následující: invertáza, melibiáza, glukooamyláza,  $\alpha$ -amyláza, inulináza, kyselá fosfatáza, kataláza, aryl- $\beta$ -glukosidáza, ATPáza, pyrofosfatáza,  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,6-glukanáza, aminopeptidáza, 5'-nukleotidáza a mananáza [45]. Enzymový aparát buněčné stěny bude zřejmě bohatší. Rovněž je pravděpodobné, že iada z přítomných enzymů bude zapojena v biosyntéze stěny nebo její degradaci. Ze zmíněných enzymů byla největší pozornost věnována invertáze.

Lipidovou složkou stěny je podle řady autorů míněna hladina volných a vázaných lipidů. V prvním případě jde o lipidy extrahovatelné organickými rozpouštědly z preparátu stěny, který nebyl hydrolyzován. Hodnoty celkové hladiny stěnových lipidů se obvykle pohybují v rozsahu 1–15 % celkové sušiny stěny, přičemž aktuální hladina je vždy v taxonomické a fyziologické závislosti. Úloha stěnových lipidů není známa. Podobně jako bílkoviny se tyto komponenty pravděpodobně podílejí na struktuře stěny. Jejich přítomnost však může souviset i s časovou a prostorovou lokalizací určitých enzymových aktivit.

#### 6. Biosyntéza stěnových polysacharidů

Pravděpodobným prekursorem v procesu biosyntézy kvasinkového glukanu je uridindifosfoglukóza (UDPG), která je zároveň předpokládaným prekursorem všech nelineárních glukánů. Podle některých představ vlastní biosyntéza probíhá mimo protoplast snad v periplazmatickém prostoru. Jiné výsledky naopak ukazují, že makromolekula glukanu vzniká uvnitř protoplastu. Mechanismus jejího transportu přes cytoplazmatickou membránu je však neznámý.

Vznik glukanových makromolekul není ovlivněn přítomností proteolytických enzymů [37], inhibicí proteosyntézy na ribozomální úrovni [38] a 5-fluorouracilem [39]. Současné představy o výstavbě glukanového skeletu stěny kvasinkové buňky se převážně opírají o výsledky získané studiem procesu resyntézy buněčné stěny u protoplastů. Fluorescenční a elektronová mikroskopie i autoradiografie přinesly informace, na základě kterých bylo možno částečně rekonstruovat vznik a prostorové uspořádání glukanových makromolekul. Glukanový skelet vzniká pravděpodobně extracelulární krystalizací těchto makromolekul nebo větších subjednotek, které vytvářejí po obvodu protoplastu koncentrační gradient. Přímá účast cytoplazmatické membrány v tomto procesu nebyla prokázána. Fibrilární síť vzniká tedy autoorganizací makromolekul glukanu nebo jejich agregátů, a to pravděpodobně bez účasti enzymového aparátu.

Podobně představa o biosyntéze mananu vychází z existence guanozindifosfomanózy (GDPM). V průběhu biosyntézy vzniká vazba manozylového zbytku na lipid, a to pravděpodobně fosfodiesterovou vazbou [40]. Aktivita zúčastněného enzymového systému je závislá na přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů. Je pravděpodobné, že vznik tohoto komplexu je podmínkou jeho přenosu přes cytoplazmatickou membránu. Z hlediska další výstavby struktury mananu existuje otázka, zda tento polymer vzniká postupným přidáváním molekul manózy nebo jsou na určitém nosiči syntézovány kratší řetězce, jejichž polymerizací vzniká hlavní řetězec obsahující vazbu  $\alpha$ -1,6-. Další otázkou v této souvislosti je mechanismus regulace celé výstavby struktury mananu, která je u daného druhu pravděpodobně nezávislá na změnách kultivačních podmínek, ploidiu a kopulačním typu [41].

K formulaci představ o vzniku mananové makromolekuly přispěly experimenty, které naznačily, že manóza nebo malé oligosacharidy jsou vázány na hydroxyl serinu nebo threoninu určitého peptidu [36]. Podle autorů této práce dochází v první fázi syntézy mananové makromo-



lekuly k přenosu manozylové jednotky na peptid, který je pravděpodobně již součástí konečného manan-bílkovinného komplexu. Jiný experimentální přístup k této otázce ukázala izolace mutantů s anomálními strukturami mananu [42].

Prekursorem bi-syntézy chitinu je UDP-N-acetylglukózamin. Zúčastněným enzymem je chitinsyntetáza, jejíž regulace na úrovni aktivity je často citovaným příkladem konverze neaktivního zymogenu v aktivní enzym účinkem aktivačního faktoru [43].

## 7. Výstavba stěny

Tato problematika je obvykle členěna do několika dílčích otázek. Především je to vlastní syntéza příslušných biopolymerů. Dále je to otázka lokalizace jednotlivých kroků této biosyntézy, tedy otázka lokalizace vzniku subjednotek a lokalizace vlastního polymerizačního procesu. S těmito procesy souvisí pak problematika transportu subjednotek z intracelulárního prostředí do oblasti stěny. Z podobných hledisek je dále sledován proces autoorganizace jednotlivých komponentů buněčné stěny. Společnou otázkou je mechanismus regulace a koordinace jednotlivých biosyntéz a jejich genetická determinace.

Přesto, že uvedené otázky jsou předmětem zájmu řady laboratoří, získané informace zatím neumožňují vyslovení podrobnějších představ o celém procesu. Celkově více informací je v těchto souvislostech pak známo o buňce bakteriální než kvasinkové.

Proces výstavby stěny je pochopitelně v závislosti na rychlosti růstu buňky. Tato rychlost je výsledkem genetické dispozice a fyziologických podmínek. V této souvislosti je rozhodující tzv. celková syntetická kapacita buňky, jejíž aktuální stav je určen a limitován rychlostí proteosyntézy. Rychlost výstavby stěny je tedy určena aktuální hladinou nutných strukturálních bílkovin a dále hladinou všech enzymů a funkčních bílkovin, které se podílejí na všech biochemických procesech, které s výstavbou stěny souvisejí.

Jinou otázkou jsou změny složení a stavby buněčné stěny v průběhu buněčného cyklu, tedy v intervalu mezi dvěma následujícími děleními buňky. V této souvislosti je poměrně známa hladina chitinu [43]. K řešení těchto otázek značně přispěla technika autoradiografického měření kinetiky inkorporace  $^{14}\text{C}$ -glukózy a použití synchronních kultur. Ve srovnání s poznanou regulací aktivity chitinsyntetázy není dosud znám způsob regulace aktivity enzymů, které kontrolují syntézu glukanu a mananu. Samovolná autolýza izolovaných stěn je důkazem přítomnosti enzymového biodegradačního systému, jehož pozitivní úlohou je kontrola včleňování nových stěnových segmentů do existující struktury stěny. I tento proces není znám. V začátcích je i genetická analýza všech těchto procesů. V tomto směru byla zatím genetické analýze podrobena biosyntéza mananu [50]. Izolace termosenzitivních mutantů s poruchou výstavby stěny ukazuje další možný experimentální přístup [51].

## 8. Biodegradace stěny

Buněčná stěna je specifickým uspořádáním biopolymerů a malých molekul v komplexní nadmolekulární strukturu. Enzymová degradace některých složek této struktury vede k jejímu rozvolnění a následující celkové degradaci. Tento proces je zároveň konverzí vegetativní formy buňky ve formu „skutečného protoplastu“. Tímto termínem je obecně míněna buněčná forma, jejíž jedinou povrchovou strukturou je cytoplazmatická membrána, neobsahující zbytky kompletní buněčné stěny. Kromě pojmu protoplast, byl v těchto souvislostech (zejména u bakteriálních buněk) zaveden pojem sféroplast, kterým je míněna buněčná forma vzniklá rovněž degradací buněčné stěny, avšak obsahující na svém povrchu její zbytky.

Je-li proces konverze vegetativní buňky ve skutečný protoplast postupný, pak buňka prochází stavem sféroplastu. Pro tento přechodný stav je u kvasinkové buňky někdy používáno termínu „prosféroplast“. Z experimentální práce je známo, že kompletní odbourání buněčné stěny je podmíněno delším působením lytických enzymů [46]. Obvykle však dochází k uvolnění protoplastu ve fázi, kdy buněčná stěna není zcela degradována. Z mikroskopického obrazu a podrobnějších studií je zřejmé, že v buněčné populaci protoplastů vždy existuje frakce sféroplastů. Velikost této frakce závisí na obecné citlivosti daného kvasinkového kmene a citlivosti individuálních buněk k lytickým enzymům. Faktory, ovlivňující tuto citlivost jsou především růstová fáze kultury a kultivační podmínky [47].

Exogenně indukovaná biodegradace stěny, která je základem experimentální přípravy kvasinkových protoplastů, je doposud založena především na použití enzymového systému, který je izolován z trávicího traktu *Helix pomatia*.

První studie, které prokazují tuto aktivitu, jsou poměrně starého data (1914–1922). V těchto experimentech nebylo použito osmotické stabilizace vzniklých protoplastů a získané výsledky nevedly k vypracování metody jejich přípravy. Koncem 50. let Eddy a Williamson [48] znovu použili trávicí šťávu získanou z *Helix pomatia*, avšak ve spojení s osmotickým stabilizátorem (manitol). Tímto způsobem byly získány první stabilní protoplasty kvasinkové buňky. Lepší stabilita protoplastů byla později dosažena použitím vyšších koncentrací tohoto stabilizátoru nebo použitím jiných osmotických stabilizátorů (sorbitol, KCl, NaCl). Otázka osmotické stabilizace protoplastů byla dále experimentálně rozvedena a byly navrženy další vhodné látky a určena i jejich specifičnost podle kvasinkových kmenů [49]. U některých kmenů *Saccharomyces* sp. byla prokázána větší rezistence k uvedenému enzymovému systému u buněk stacionárních ve srovnání s buňkami exponenciálními. Různá citlivost byla však zaznamenána i mezi kmeny *Saccharomyces* sp., které byly kultivovány za stejných podmínek a konverze v protoplast byla provedena u buněk ze stejné růstové fáze. Byl vysloven předpoklad, že citlivost buněčné stěny je do určité míry určena rezistencí manan-bílkovinného komplexu. Do této souvislosti lze uvést informaci, že předprava buněk působením sirných sloučenin obecně snižuje rezistenci jejich stěn v biodegradaci. V laboratorní praxi je dnes v těchto souvislostech obvykle používán merkaptotetanol. Z hlediska buněčné stěny je možné předpokládat, že jakýkoliv zásah vedoucí k porušení její integrity může nepřímo ovlivnit průběh její biodegradace. Účinnost použitého lytického systému může být teoreticky znásobena všemi agens, které mohou degradovat přítomné biopolymery i malé molekuly stěny.

Surová trávicí šťáva *Helix pomatia* obsahuje několik desítek enzymů. Jejím přesnému složení z hlediska enzymové aktivity nebylo zatím věnováno mnoho pozornosti. Celý komplex lze rozdělit na frakci schopnou degradovat buněčnou stěnu a na frakce, které jsou v tomto případě inaktivní [50]. V zastoupení jednotlivých enzymů existují rozdíly dané ekologickými vlivy a dalšími faktory. Zmíněný lytický systém má rovněž omezené spektrum účinnosti. Vypracování univerzální metody přípravy kvasinkových protoplastů, která je nyní velmi aktuální, vyžaduje proto studium dalších zdrojů těchto enzymových systémů, popř. konstrukci optimálních lytických systémů *in vitro*.

## Literatura

- [1] SALKOWSKI, E.: Ber. dt. Chem. Ges. **27**, 1894, s. 3325
- [2] BISHOP, C. T., BLANK, F. and GARDNER, P. E.: Can. J. Chem., **38**, 1960, s. 869



- [3] NORTHCOTE, D. H. and HORNE, R. W.: Biochem. J. **51**, 1952, s. 232
- [4] ROELOFSEN, P. A.: Biochim. Biophys. Acta **10**, 1953, s. 477
- [5] KREGER, D. R.: Biochim. Biophys. Acta **13**, 1954, s. 1
- [6] FALCONE, G. and NICTERSON, W. J.: Science, N. Y., **124**, 1956, s. 272
- [7] FLEET, G. H. and MANNERS, D. J.: J. Gen. Microbiol. **94**, 1976, s. 180
- [8] TANAKA, H. and PHAFF, H. J.: J. Bact. **89**, 1965, s. 1570
- [9] MANNERS, D. J. and PATTERSON, J. C.: Biochem. J. **98**, 1966, s. 190
- [10] Mc MURROUGH, I. and ROSE, A. H.: Biochem. J. **105**, 1967, s. 189
- [11] BARRY, V. C. and DILLON, T.: Proc. R. Ir. Acad. **49B**, 1943, s. 117
- [12] BELL, D. J. and NORTHCOTE, D. H.: J. Chem. Soc. **1950**, s. 1944
- [13] PEAT, S., WHELAN, W. J. and EDWARDS, T. E.: J. Chem. Soc. **1958**, s. 3862
- [14] MISAKI, A., JOHNSON, J., KIRKWOOD, A., SCALETTI, J. V. and SMITH, F.: Carbohydrate Research **6**, 1968, s. 150
- [15] MANNERS, D. J., MASSON, A. J. and PATTERSON, J. C.: J. Gen. Microbiol. **80**, 1974, s. 411
- [16] BUSH, O. A., HORISBERGER, M., HORMAN, I. and WUASCH, P.: J. Gen. Microbiol. **81**, 1974, s. 199
- [17] NEČAS, O., KOPECKÁ, M.: Folia Microbiol. **15**, 1970, s. 198
- [18] KOPECKÁ, M., GABRIEL, M., NEČAS, O.: J. Gen. Microbiol. **81**, 1974, s. 111
- [19] HAWORTH, W. N., HEATH, R. L. and PEAT, S.: J. Chem. Soc. **1941**, s. 833
- [20] PEAT, S., TURVEY, J. R. and DOYLE, D.: J. Chem. Soc. **1961**, s. 3918
- [21] JONES, G. H. and BALLOU, C. E.: J. Biol. Chem. **243**, 1968, s. 2443
- [22] STEWART, T. S. and BALLOU, C. E.: Biochemistry, N. Y., **7**, 1968, s. 1855
- [23] GORIN, P. A. J., SPENCER, J. F. T. and MacKENZIE, S. L.: Can. J. Chem. **44**, 1966, s. 2687
- [24] KOCOUREK, J. and BALLOU, C. E.: J. Bact. **100**, 1969, s. 1175
- [25] GORIN, P. A. J., SPENCER, J. F. T. and BHATTACHARGEE, S. S.: Can. J. Chem. **47**, 1969, s. 1499
- [26] BALLOU, C. E.: Adv. Enzymol. **40**, 1974, s. 239
- [27] JONES, G. H. and BALLOU, C. E.: J. Biol. Chem. **244**, 1969, s. 1052
- [28] MILL, P. J.: J. Gen. Microbiol. **44**, 1966, s. 329
- [29] JONES, G. H. and BALLOU, C. E.: J. Biol. Chem. **244**, 1969, s. 1052
- [30] THIEME, T. R. and BALLOU, C. E.: Biochemistry **10**, 1971, s. 4121
- [31] GORIN, P. A. J., SPENCER, J. F. T. and MAGUS, R. J.: Can. J. Chem. **47**, 1969, s. 3569
- [32] HASENCLEVER, H. F. and MITCHELL, W. O.: Sabouradia **3**, 1964, s. 288
- [33] RASCHKE, W. C. and BALLOU, C. E.: Biochemistry **10**, 1971, s. 4130
- [34] SUZUKI, S., SUNAYAMA, H. and SAITO, Z.: Jap. J. Microbiol. **12**, 1968, s. 19
- [35] SCHMIDT, M.: Arch. Mikrobiol. **7**, 1936, s. 241
- [36] SANTANDREU, R. and NORTHCOTE, D. H.: Biochem. J. **109**, 1968, s. 419
- [37] KOPECKÁ M., NEČAS, O. and SVOBODA, A.: In: O. Nečas and A. Svoboda [ed.], Yeast Protozoa Proc. Int. Symp., Brno
- [38] SOŠKOVÁ L., SVOBODA, A. and SOŠKA, J.: Folia Microbiol. **13**, 1968, s. 240
- [39] SOŠKOVÁ, L., SVOBODA, A. and SOŠKA, J.: Folia Microbiol. **15**, 1970, s. 442
- [40] TANNER, W.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **35**, 1968, s. 144
- [41] THIEME, T. R. and BALLOU, C. E.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **39**, 1970, s. 621
- [42] RASCHKE, W. C. and BALLOU, C. E.: Biochemistry **11**, 1972, s. 3807
- [43] CABIB, E., FARKAŠ, V.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68**, 1971, s. 2052
- [44] EDDY, A. A. and LONGTON, J.: J. Inst. Brew. **75**, 1969, s. 7
- [45] PHAFF, H. J.: V „The Yeasts“, ed. A. H. Rose, J. S. Harrison, Vol. 2, s. 135 (1971) New York, Academic Press
- [46] GARCIA-MENDOZA, C. and S. R. VILLANUEVA: Nature (London) **202**, 1964, s. 1241
- [47] ANDERSON, F. B. and MILLBANK, J. W.: Biochem. J. **99**, 1966, s. 682
- [48] EDDY, A. A. and WILLIAMSON, D. H.: Nature (London) **183**, 1959, s. 1101
- [49] CASCÓN, S. and VILLANUEVA, S. R.: Nature (London) **205**, 1965, s. 822
- [50] RASCHKE, W. C., KERN, K. A., ANTALIS, C. and BALLOU, C. E.: J. Biol. Chem. **248**, 1973, s. 4860
- [51] HARTWELL, L. H., CULOTTI, J., PRINGLE, J., REID, R.: Science **183**, 1974, s. 46

**Jirků, V., Basařová, G.: Hlavní aspekty studia kvasinkové buněčné stěny.** Kvas. prům., **29**, 1983, č. 10, s. 220—224.

Naše současné chápání povahy kvasinkové buněčné stěny je založeno na informacích získaných chemickými a biochemickými studiemi, včetně enzymového odbourávání stěny a studiemi cytologickými. V této souvislosti se tento přehledný článek týká vývoje našich znalostí o základních strukturálních komponentech a biochemii kvasinkové stěny. Pozornost je rovněž věnována biosyntéze hlavních polysacharidů a biosyntéze stěny. V dalších kapitolách se článek stručně zabývá hlavními aspekty biodegradace stěny, indukované exogenními lytickými enzymy, a to zvláště těmi, které jsou součástí trávicí šťávy hlemýžďe zahradního, *Helix pomatia*.

**Ирку, В., Басаржова, Г.: Главные аспекты исследования клеточной стенки дрожжей.** Квас. прум. **29**, 1983, № 10, стр. 220—224.

Современное понимание характера клеточной стенки дрожжей основано на сведениях, полученных путем химического и биохимического исследования, включая enzymную деструкцию стенки, и путем цитологического исследования. В связи с тем опубликованная статья занимается развитием наших знаний основных и структурных компонентов и биохимии клеточной стенки. Внимание также уделяется биосинтезу главных полисахаридов и биосинтезу стенки. В следующих главах статья вкратце приводит главные аспекты биodeградации стенки, вызванной экзогенными литическими энзимами, в особенности теми, которые являются составной частью пищеварительного сока улитки садовой, *Helix pomatia*.

**Jirků V., Basařová G.: The basic aspects of yeast cell wall study.** Kvas. prům., **29**, 1983, No. 10, pp. 220—224.

Our present understanding of the nature of yeast cell wall is based on the information obtained from chemical and biochemical studies, including enzymic digestion of wall and from cytological investigations. In this connection, this review deals with the development of our knowledge of the basic structural components and biochemistry of yeast cell wall. Attention is also paid to the biosynthesis of principal polysaccharide components as well as cell wall biosynthesis. In addition, the article covers briefly the major aspects of cell wall biodegradation by exogenous lytic enzymes, especially by gastric juice of the garden snail, *Helix pomatia*.

**Jirků, V. - Basařová, G.: Hauptaspekte des Studiums der Hefezellwand.** Kvas. prům. **29**, 1983, Nr. 10, S. 220—224.

Unsere gegenwärtigen Vorstellungen über den Charakter der Hefezellwand basiert auf Informationen, die durch chemische und biochemische Studien (einschließlich der Studien über den Abbau der Zellwand mittels Enzyme), sowie auch zytologische Studien gewonnen wurden. In diesem Zusammenhang enthält der Artikel eine übersichtliche Erfassung unserer Erkenntnisse über die strukturellen Grundkomponenten und die Biochemie der Hefezellwand. Auch der Biosynthese der hauptsächlichlichen Polysaccharide und der Biosynthese der Zellwand wird in der Arbeit Aufmerksamkeit gewidmet. In den weiteren Abschnitten behandelt der Artikel zusammenfassend die Hauptaspekte der Biodegradation der Zellwand, die durch exogene lytische Enzyme induziert wird, und zwar vor allem diejenige, die in dem Verdauungssaft der Weinbergsschnecke, *Helix pomatia*, enthalten sind.