

Pokus o řízenou změnu kvasných vlastností drožďařských kvasinek

OLDŘICH NEČAS — ANTONÍN KARÁSEK,

Biologický ústav lékařské fakulty university v Brně. Za technické spolupráce Věry Burešové

663.1

Radě autorů (Kosíkov 1954, 1956, 1957, Scheffner a McClary 1955) se podařilo přizpůsobit kvasinky na zkvašování cukru, který daný druh kvasinek původně nezkašoval. Dosáhli toho kultivací kvasinek na půdě s tímto cukrem. Adaptaci kvasinek na daný cukr možno urychlit, přidáme-li ke kulturám homogenát jiného druhu kvasinek, který tento cukr zkvašuje (Kosíkov 1950, Dmítraško 1955) nebo přidáme-li přímo příslušný izolovaný enzym (Oparin a Jurkevič 1949). V řadě případů však pokusy o adaptaci na určitý cukr u některých kvasinkových druhů selhaly, např. pokusy o adaptaci drožďařských kvasinek na zkvašování melibiosy (Kosíkov 1957).

Pokusili jsme se využít k adaptaci na zkvašování nových cukrů námi zjištěného procesu regenerace kvasinkových buněk z buněčných fragmentů a bezblanných protoplastů (Nečas 1955 a, b). Získání kmenů drožďařských kvasinek, které by měly jako trvalou vlastnost zkvašování melibiosy, by mohlo mít značný význam při průmyslovém zkvašování melasy (Dyr 1956).

Během celého procesu regenerace kvasinkových buněk a během regenerace bezblanných protoplastů kvasinek nastávají značné morfologické přeměny. Fragmenty a protoplasty (získávané naší metodou autolysy buněčné blány; Nečas 1955 a) po naočkování na tuhé půdy intenzivně rostou, vytvářejí se tzv. plasmatické útvary. Tyto jsou i nadále bezblanné, obsahují více jader a po dalších strukturních přeměnách některé z nich regenerují v nové kvasinkové buňky. Některé z kmenů nově zregenerovaných kvasinek se ve svých morfologických i některých biochemických vlastnostech liší od vlastností výchozího kmene (Nečas a Dyr 1957). Celý proces regenerace, od naočkování protoplastů až po nové buňky, trvá zpravidla 5 dní. Lze předpokládat, že značné morfologické přeměny jsou doprovázeny i určitými změnami biochemickými. Naskytá se tedy možnost vhodným sestavením podmínek využít tak jakési rozkolísanosti metabolismu k záměrné přeměně biochemických vlastností např. k pokusu o adaptaci na zkvašování některých cukrů.

Ve svých pokusech jsme se tímto způsobem snažili dosáhnout u drožďařských kvasinek adaptace na zkvašování laktosy a melibiosy.

Metodika

K pokusům jsme používali kmene drožďařských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, získaného z droždí izolací jedné buňky. Že tento kmen nezkašuje laktosu a melibiosu, jsme si ověřili chromatograficky. Základní kulturu jsme pěstovali ve zkumavkách se sladinou asi 12° Bg. Fragmenty kvasinkových buněk a bezblanné protoplasty jsme získávali námi vypracovanou metodou autolysy buněčné blány (Nečas 1956 a). Po odebrání z povrchu autolysující kultury

byly protoplasty suspendovány v N I půdě (25 g asparaginu, 25 g KH_2PO_4 , 8,5 g MgSO_4 , 1000 g vody). Cukry do této půdy byly přidávány v různé kombinaci (viz dále) tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 10 %. Tato koncentrace je nutná pro zajištění potřebného osmotického tlaku prostředí. Suspensi plasmatických útvarů jsme očkovali na agarové filmy ve vlhkých komůrkách na mikroskopických sklíčkách. Agarové filmy obsahovaly opět půdu s různou sestavou cukrů a 3 % agaru a popř. filtráty homogenátů či autolysátů pivovarských kvasinek. Na agarových filmech se vyvíjely protoplasty a vznikaly tzv. hutné plasmatické útvary. Regenerace buněk nastala buď přímo v těchto preparátech nebo po dalším přeočkování hutných plasmatických útvarů v tekuté N I půdě (opět s příslušnými cukry nebo filtráty) na mikroskopická sklíčka. Zregenerované buňky byly izolovány a přeneseny jednak do zkumavek s tekutými půdami, jednak na misky s půdami tuhými. Některé izoláty byly tvořeny buňkami, které vznikly regenerací z jednoho plasmatického útvaru, jiné byly směsí kvasinek zregenerovaných z několika (až několika desítek) plasmatických útvarů.

Při pokusech o adaptaci drožďařských kvasinek na melibiosu jsme přidávali do půd, na kterých se plasmatické útvary vyvíjely a regenerovaly, homogenát nebo autolysát pivovarských kvasinek, které melibiosu zkvašují. Homogenáty pivovarských kvasinek byly připraveny třením kvasinek s křemenným pískem v třecí misce. Po 1 až 2 hod. tření, když bylo mikroskopicky zjištěno, že nejméně 80 % buněk je neporušeno, byl homogenát zředěn tekutou N I půdou a přefiltrován membránovým kolodiovým filtrem o porositě 500 m μ . Při filtraci se odstranily zachované buňky, strukturální elementy rozdrčených buněk a současně byl sterilován (byly používány filtry nepropouštějící bakterie). Při získávání autolysátů jsme nechali kašovitou suspenzi pivovarských kvasinek v termostatu při 37° C po 3 dny v Erlenmayerově baňce. Autolysát byl opět přefiltrován membránovým filtrem. Filtráty homogenátu nebo autolysátu byly pak podle potřeby (v různém poměru) přidávány k živným půdám. Zda homogenáty melibiosu skutečně obsahují, nebylo zjištěno.

Z prokvašených kultur očkovaných zregenerovanými kvasinkami jsme odebírali 0,04 ml pro chromatografické určování. V sestupné chromatografii tvořila pohyblivou fázi směs butanolu, kyseliny octové a vody v poměru 2:1:5. Vyvíjení trvalo 24 hod. při pokojové teplotě. K detekci cukrů jsme zvolili kyselý ftalát anilinu (anilin 0,93 g, kyselina ftalová 1,66 g postupně rozpouštěné ve 100 ml n-butanolu nasyceného vodou). Chromatogramy byly sušeny v sušárně při 115° C. V každé serii jsme jako kontrolu provedli chromatografii příslušných čistých cukrů.

Výsledky pokusů

a) *Adaptace na zkvašování laktosy*

Bezblanné protoplasty kvasinkových buněk a jejich fragmenty se po naočkování na N I půdu s 10% laktosy začaly vyvíjet jako v preparátech kontrolních (s glukosou). Záhy však se jejich vývoj zastavil. Proto jsme k půdám přidávali spolu s laktosou 1 % glukosy. Regenerace buněk z plasmatických útvarů nastávala i na půdách s laktosou bez glukosy, avšak pouze za aerobních podmínek (na půdách s glukosou naopak anaerobní podmínky regeneraci podporují).

Celkem jsme v 5 pokusných seriích získali v 58 preparátech 221 regenerujících útvarů. Z těchto preparátů bylo izolováno celkem 39 kmenů. Isolované kmeny jsme přenesli do tekutých půd ve zkumavkách a dále pasážovali. V přehledu je uvedeno složení použitých půd, na kterých byly kultivovány zregenerované izoláty, pasáž, stáří kultury, ve kterém byl proveden odběr vzorku pro chromatografii a výsledek chromatografie.

Živná půda	kmeny	pasáž	stáří kult.	laktosa
NI s 10% laktosy	L 12-18	1	8 dní	+
	L 6-11		15 dní	+
	L 6-11		19 dní	+
	L 12-18		24 dní	+
	L 6-11	2	7 dní	+
	L 6-11		6 dní	+
sladina 40 Bg s 0,5 % laktosy	L 6-11	3	7 dní	+
	L 6-11	4	6 dní	+
	všechny		6 dní	+
	16 kmenů		28 dní	+
	25 kmenů		55 dní	+
kvasničná voda s 0,5 % laktosy	všechny	7	6 dní	+
	všechny	8	6 dní	+
	všechny	10	9 dní	+

Celkem jsme vyhodnotili 357 chromatogramů. Ve všech případech (pokud byla půda vůbec prokvašena) jsme na chromatogramech laktosu našli a pokud lze z intenzity skvrn vizuálně vyhodnotit, v podstatě v nezměněném množství. Laktosa zůstala nedotčena i po 10. pasáži zregenerovaných kvasinek na půdách s laktosou i po 55 dnech prokvašování např. v 5. pasáži, kdy všechny ostatní cukry sladiny jsou již dávno zkvašeny.

Z výsledků můžeme tedy uzavřít, že vývoj plasmatických útvarů a jejich regenerace za přítomnosti laktosy s následným pasážováním opět na půdách s laktosou nevede k adaptaci ve zkvašování tohoto cukru.

b) *Adaptace na zkvašování melibiosy*

V první fázi pokusů k získání adaptace droždářských kvasinek na zkvašování melibiosy jsme jako cukr dávali do živných půd rafinosu. Rafinosa je štěpena droždářskými kvasinkami na fruktosu, která je využita a na melibiosu, kterou tyto kvasinky nemají schopnost zkvašovat.

Protoplasty kvasinek se vyvíjely a zregenerovaly na N I půdě s 10 % rafinosy. Celý průběh regenerace byl zcela obvyklý. Ve třech seriích pokusů bylo ve 40 preparátech zjištěno 357 případů regenerace. Z toho bylo izolováno 50 kmenů zregenerovaných kvasinek. Zregenerované kvasinky jsme přenesli nejprve na tuhé půdy téhož složení a ve druhé pasáži do melasy ve zkumavkách. K chromatografickému stanovení výsledků přetvoření bylo namátkou vybráno pouze 22 kmenů. V následujícím přehledu jsou uvedeny intervaly odběru vzorků pro chromatografii spolu s výsledky.

živná půda	kmeny	pasáž	stáří kultury	melibiosa
melasa	22 kmenů tytéž kmeny 6 z nich	2	14 dní 36 dní 72 dní	+

V konečné serii chromatogramů byla jako kontrola nanášena čistá melibiosa a vzorky z kultur zaočkovovaných pivovarskými kvasinkami.

Z výsledků je patrné, že kvasinky zregenerované z plasmatických útvarů na půdách s rafinosou mají z tomtého směru tytéž kvasné schopnosti jako výchozí kmen, tj. štěpí rafinosu, fruktosu využívají a melibiosa zůstává.

V dalších seriích pokusů probíhal celý proces regenerace protoplastů na N I půdách s 1 % melibiosy, 0,2 % glukosy a 8 % laktosy (pro udržení osmotického tlaku). Průběh vývoje plasmatických útvarů a jejich regenerace byla normální. Ze 118 zregenerovaných útvarů jsme získali 27 izolátů. Izoláty byly přeočkovány do melasy a po týdnu prokvašování byly brány vzorky pro chromatografii. Ve všech kulturách byla melibiosa nedotčena. Z toho lze uzavřít, že pouhá kultivace plasmatických útvarů a jejich regenerace na půdách s melibiosou nevede k adaptaci na zkvašování tohoto cukru.

V dalších pokusech jsme se snažili indukovat tvorbu adaptivního enzymu tj. melibiázy přidáním homogenátů a autolysátů pivovarských kvasinek, které melibiosu zkvašují.

Ve 23 pokusných seriích byly zvoleny různé kombinace v sestavě živných půd. V podstatě obsahovaly 1 % melibiosy, 0,1 % nebo 1 % glukosy a filtrát homogenátu nebo autolysátu pivovarských kvasinek. Ke všem seriím byly provedeny kontroly, kde živnou půdu tvořila minerální N I půda s glukosou. Na všech použitých půdách probíhal vývoj plasmatických útvarů i regenerace normálně, zvláště častou regenerací jsme nacházeli na půdách s autolysátem. V preparátech všech pokusných serií bylo zjištěno 1404 případů regenerace. Z toho bylo izolováno 271 kmenů zregenerovaných kvasinek. Izoláty byly přeneseny do tekuté melasové půdy ve zkumavkách. Ze zaočkovovaných kultur byly odebrány vzorky pro chromatografii podle tohoto schématu:

pasáž	kmeny	stáří kultury ve dnech	melibiosa	
			+	-
1	všech 271 51 kmenů	14-20 45	263 43	8 8
2	21 kmenů	10 32 47	21 21 21	0 0 0
3	21 kmenů	5	21	0
4	21 kmenů	14	21	0

V kulturách, ve kterých jsme zjistili na chromatogramu vymizení melibiosy, jsme provedli další den kontrolu, abychom vyloučili možnou technickou chybu. Těmito kontrolami jsme ověřili, že 8 isolátů zkvašuje v melase melibiosu. Těchto 8 kmenů spolu s dalšími 13 kmeny, které melibiosu v první pasáži nezkvašovaly, bylo přeočkováno do 2. pasáže. V této druhé pasáži jsme v chromatogramech melibiosu našli i po 47 dnech po naočkování kultur u všech kmenů, tj. i u těch, které melibiosu v 1. pasáži zkvašovaly. Stejně tak tomu bylo ve 3. a 4. pasáži. Další pasážování jsme již neprováděli.

Z výsledků vyplývá, že 8 z 271 kmenů drožďařských kvasinek, které zregenerovaly na půdách s autolysáty či homogenáty pivovarských kvasinek získalo schopnost zkvašovat melibiosu melasy. Ve druhé pasáži na melase tuto schopnost opět ztratily.

Diskuse

Ze všech výsledků vyplývá, že pouhá kultivace bezblanných protoplastů drožďařských kvasinek a jejich fragmentů a následná regenerace v buňky na půdách s laktosou a melibiosou nestačí, aby došlo k adaptaci na zkvašování těchto cukrů.

Naproti tomu přítomnost autolysátu nebo homogenátu pivovarských kvasinek, které melibiosu zkvašují, vede v některých případech (v 8 z 271) k této adaptaci. Ve druhé pasáži však u těchto 8 kmenů schopnost zkvašovat melibiosu opět zmizela. Zregenerované kvasinky jsme kultivovali na melase, která podle našich chromatografických semikvantitativních zjištění (srovnání sytosti skvrn na chromatogramech se standardy) obsahovala 0,5 až 1 % melibiosy. Zbytek sacharidů tvořily snadno zkvasitelné cukry. Aby se eventuální nová vlastnost tj. zkvašování melibiosy u zregenerovaných kvasinek upevnila, bylo by nutno pěstovat zregenerované kvasinky po izolaci na půdách, které by obsahovaly jako jediný cukr melibiosu (ev. nepatrný podíl glukosy). Jelikož melasa obsahuje převážnou většinu cukru pro drožďařské kvasinky snadněji zkvasitelných, nedošlo patrně k upevnění v průběhu regenerace získané nové vlastnosti tj. zkvašování melibiosy a v druhé pasáži již tato vlastnost opět vymizela. Naprostý nedostatek čisté melibiosy nám však žádané uspořádání pokusů nedovolil uskutečnit.

Kontrola skutečného obsahu melibiosy v homogenátech a filtrátech pivovarských kvasinek, ev. možnost přidáním čistého enzymu do půd by jistě pokusy

značně zpřesnila. Nemáme totiž evidenci, zda některé ze šarží homogenátů či autolysátů melibiosu vůbec obsahovaly. Positivní výsledky (tj. kmeny zkvašující melibiosu) jsme získali pouze ve 4 z 23 pokusných serií.

Dosavadní výsledky pokusu naznačují, že v zásadě lze regenerace bezblanných protoplastů kvasinek a jejich fragmentů využít k záměrnému získání nových kvasných vlastností. Domníváme se, že při dostatečném technickém zajištění pokusů by bylo lze získat i kmeny, které by nové kvasné vlastnosti podržely trvale.

Závěr

V pokusech jsme se snažili dosáhnout u drožďařských kvasinek adaptace ke zkvašování laktosy a melibiosy při regeneraci kvasinkových buněk z bezblanných protoplastů a jejich fragmentů. Pouhá kultivace protoplastů a jejich regenerace na půdách s těmito cukry k vyvolávání adaptace nestačí. Při regeneraci na půdách s filtrátem homogenátu či autolysátu pivovarských kvasinek, které melibiosu zkvašují, jsme z 271 izolovaných kmenů získali 8 kmenů drožďařských kvasinek, které melibiosu zkvašovaly. Během pasážování na melase tyto kvasinky schopnost zkvašovat melibiosu opět ztratily.

РЕЗЮМЕ

Авторы при своих экспериментах пытались развить у пекарных дрожжей способность сбраживать лактозу и мелибиозу при регенерации дрожжевых клеток на протопластах и их фрагментах. Простое культивирование протопластов и их регенерация на средах содержащих указанные виды сахаров является для адаптации недостаточным. При регенерации на средах содержащих фильтраты гомогената или автолизата пивных дрожжей, которые обладают способностью сбраживать мелибиозу, авторам удалось выделить из 271 пробы изолированных культур 8 проб пивных дрожжей способных вызвать брожение мелибиозы. При переходе на мелясу дрожжи эту способность снова утрачивали.

Literatura

- DMITRAŠKO P. I.: Napravlennoe izmenenie drožžej. Tr. Odessk. Instituta, 91, 145 (1955).
- DYR V.: 1956, ústní sdělení.
- KOSIKOV K. V.: Napravlennoe izmenenie svojstva mikroorganizmov pod vlivem preparátov polučenných ot rodstvennyh štama. Tr. Inst. genetiki 185, 18 (1950).
- KOSIKOV K. V.: Genetika drožžej i metody selekcii drožževych kultur. I A N SSSR, Moskva 1954.
- KOSIKOV K. V.: O někotorych zakonomernostjach napravlennoj izmenčivosti mikroorganizmov. I A N SSSR Ser. biol. No. 5,23, 1956.
- KOSIKOV K. V.: Napravlenaja nasledstvennaja izmenčivost fermentativnyh svojstv drožžej pod vlijanijem specifičeskego substrata. Ž. obšč. biol. 18, 476, 1957 a.
- KOSIKOV K. V.: 1957 b, ústní sdělení.
- NEČAS O.: Životaschopnost buněčnych fragmentů kvasinek III. Vývojové změny plasmatických koulí z autolysátu. Čs. Biologie 4, 287, 1955 a.
- NEČAS O.: Životaschopnost buněčnych fragmentů kvasinek. IV. Regenerace buněk z plastických útvarů. Čs. biologie 4, 338, 1955 b.
- NEČAS O., DYR V.: Životaschopnost buněčnych fragmentů kvasinek. VI. Vlastnosti regenerujících buněk. Čs. biologie 6, 50, 1957.
- OPARIN A. I., JURKEVIČ V.: Ob adsorbicii fermentov drožženymi kletkami. DAN SSSR 66, 247, 1949.
- SHEFFNER A. L., McCLARY D. O.: The oxidation of galactose in the presence of 2,4 dinitrophenol as a measure of galactose adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 57 (1955) 401.