

Možnosti šľachtenia niektorých typov kvasiniek

LUDMILA RABANOVÁ, Ústredný výzkumný ústav potravinárskeho priemyslu, pobočka Bratislava

663.12/14

Kvasinky možno právom považovať za jeden z najstarších človekom pestovaných organizmov. Kuriózna je azda skutočnosť, že po dlhé stáročia boli využívané ich fermentačné schopnosti bez toho, že by bola známa podstata, teda i vlastný pôvodca s tým spojených procesov — kvasinkové bunky. Túto možnosť prinieslo až poznanie mikroskopu a s ním súvisiace poznávanie a štúdium mikroorganizmov.

Napriek spomenutému zvláštnemu stavu historického procesu úlohy kvasiniek v živote človeka, možno v súvislosti s výrobou produktov kvasných procesov už od najstarších čias hovoriť o akýchsi, i keď nevedomých, šľachtiteľských postupoch. Spocívali vo viac menej cieľavedomej selekcii, pri ktorej kritériom bol až sekundárny zjav, teda výsledok procesu, bez znalosti jeho príčiny.

V súčasnej dobe sú kvasinky objektom pomerne dobre prebadaným. Vďaka poznaniu ich ponlavného cyklu, o ktoré sa v prvom rade zaslúžil *profesor Satava* (1918), boli do značnej miery analyzované i po stránke genetickej, a to predovšetkým zásluhou škôl *O. Winge*ho v Dánsku, *C. C. Lindegrena* v Amerike a *K. V. Kosikova* v SSSR. V mnohých prípadoch je známy napr. genotypový základ systému skvasovania cukrov, pri ktorom je pozorovaná a z hľadiska aplikácie v praxi nie malo vyznamná skutočnosť, že u doteraz prebadaných cukrov a typov kvasiniek, sa schopnosť skvasovania dedí dominantne. Toto prakticky obecné pravidlo platí i pre prípady polymerického (viacerými genovými medzi riadeného), založenia kvasivej schopnosti, ako je tomu napr. u maltózy, kde je predbežne známych šesť vlonových párov pre fermentačnú schopnosť, u galaktózy s tromi pámi faktorov ap. Do určitej miery je preštudovaná dedičnosť biosyntézy niektorých aminokyselín, čiastočne tvarové charakteristiky či už jednotlivých buniek alebo celých kolónií, ktoré sa dedia napodiv komplikovane, otázka pohlavného typu, pre ktorý sa vo väčšine prípadov uvádza homothalia (schopnosť splývania pohlavných buniek rovnakého pôvodu) a konečne v určitom rozsahu i aglutinačné vlastnosti a schopnosť rezistencie.

Všetky uvedené charakteristiky boli zväčša analyzované u kultúrnych kvasiniek rodu *Saccharomyces*, čo do značnej miery zrejme súvisí s tendenciou využívať získané poznatky v praxi. Práce, s týmito analýzami spojené, totiž často, ak nie prevažne, pochádzajú z laboratórií výrobných podnikov. Žiaľ, práve u nás, v krajine pôsobenia *prof. Satavu*, sme v tomto smere úplne stagnovali a dnes stojíme na samom začiatku aplikácie genetických výskumov pre šľachtiteľské ciele u priemyselne tak významných organizmov ako sú kvasinky.

Pri cieľavedomom získavaní nových produkčných kmeňov či už v pivovarníctve, vinárstve, droždiarstve a liehovarníctve, alebo v produkcii biomasy u kvasinkovitých mikroorganizmov pre krmovinárske účely, možno využívať všetky šľachtiteľské po-

stupy aplikované u vyšších, predovšetkým rastlinných organizmov. Je to hybridizácia (spájanie dedične odlišných jedincov), polyploidizácia (zvyšovanie základného počtu chromozomov) i prirodzená, potažne umele vyvolaná mutabilita. V našich pomeroch, kde ešte dnes sa výber kmeňového materiálu pre jednotlivé výrobné procesy robí viac menej náhodne, možno značné úspechy očakávať i od púhej avšak cieľavedomej selekcie. Z toho hľadiska je veľkou výhodou kvasinkovitých mikroorganizmov ich obrovská variabilita, ktorá bude zrejme do značnej miery podmienená ich stáročnou existenciou vo forme kultúrneho organizmu. Variabilita kvasiniek, ktorá predpokladá vysokú citlivosť voči zmenám životných podmienok, má však na druhej strane i svoje tienisté stránky. Cieľom šľachtiteľa je totiž nielen získavať vysokovýkonné kmeňe pre dané výrobné procesy, ale aj štabilizovať ich vlastnosti, napriek možným výkyvom vo výrobných podmienkach ich kultivácie. A z tohto hľadiska budú značné problémy pri zavádzaní kontinuálnych výrobných.

Z šľachtiteľských cieľov u kvasiniek rozvediem azda iba potreby droždiarskeho priemyslu a potrebu získavať hodnotnú biomasu pre krmovinárske účely, ktorým sa predovšetkým začíname venovať na našom pracovisku.

U pekárskych kvasiniek je cieľom komplex vlastností zahrnujúci výťažnosť droždia, fermentačnú aktivitu na sacharóze ako zdroji cukrov v melase, prinajmenšom rovnakú, prípadne vyššiu aktivitu na maltóze, ktorá je podstatným produktom procesu hydrolyzy v múke, vysokú mohutnosť kysnutia v ceste a konečne dobrú trvanlivosť. Naše domáce typy produkčného droždia sú nadané dosť vysokou aktivitou na sacharóze, čo zrejme súvisí s adaptáciou na výrobný proces s podstatnou zložkou uhľkatých živín z melasy, kým maltózová aktivita je u nich nízka. Tým azda možno vysvetliť i pomerne slabú mohutnosť kysnutia v ceste, ktorá, vyjadrená podľa uzančnej metódy tromi dobami kysnutia na daný objem, dosahuje časy 120 až 150 min. Preto sa zameriavame na výrobu vysokoaktívneho droždia, charakteristického zvlášť dobre vyvinutou schopnosťou skvasovania maltózy a v súvisi s tým vysokou mohutnosťou kysnutia v ceste. V tomto smere sme selekciou monokultúr z merkantilného droždia, zahraničného pôvodu, získali niekoľko kmeňov s aktivitou na maltóze vyššou až o 50 % oproti pôvodnému materiálu a až o 300 % v porovnaní s domácim droždím, u ktorých sa mohutnosť kysnutia pohybuje v hraniciach 70 až 90 min.

U kvasinkovitých mikroorganizmov pre krmovinárske účely je predovšetkým cieľom vysoká produktivita biomasy hodnotnej z nutričného hľadiska. Z toho dôvodu je našou snahou zvyšovať u šľachtiteľského materiálu schopnosť biosyntézy esenciálnych aminokyselín a i touto cestou obohacovať krmivá. Z hľadiska technologického je potom veľmi dôležité získavať kmeňe vhodné pre bežné technologické

ké spracovanie, najmä pokiaľ ide o separáciu biomasy. V tejto oblasti šľachtenia budeme totiž v mnohých prípadoch vychádzať z rozličných druhov rodu *Torulopsis*, prípadne *Candida*, vyznačujúcich sa drobnými, v prípade rodu *Candida* mycelio- alebo pseudomyceliotvornými bunkami, ktorých separácia značne komplikuje výrobný proces. U kvasinkovitých mikroorganizmov pre krmovinárske účely bude konečne treba prihliadať i k možnostiam využívania odpadných látok z priemyslových výrob. To znamená upraviť ich asimilačné spektrum tak, aby boli schopné vyhovovať i tejto požiadavke a aby sa pomohlo nášmu priemyslu aspoň čiastočne riešiť naliehavú otázku odpadných vôd. V tejto súvislosti bude potrebné zaoberať sa i problémom nebezpečia kontaminácie pri kombinovaných výrobných krmného droždía s inými produktami vyrábanými na báze kvasiniek, ktoré sa v budúcnosti plánujú v dosť širokom meradle.

Spôsoby získavania nových kmeňov či už pekárskych kvasiniek, alebo kvasinkovitých mikroorganizmov pre krmovinárske účely, treba prispôbovať jednak východiskovému materiálu, jednak žiadanému šľachtiteľskému cieľu.

U pekárskych kvasiniek, kde východiskovým materiálom môžu byť druhy rodu *Saccharomyces*, s hlavným ťažiskom u druhu *S. cerevisiae*, ako ukazujú zahraničné skúsenosti, sa dobre uplatňuje hybridizácia. Možno jurobiť individuálne mikromanipulačnou metódou alebo masovo, prostou spoločnou kultiváciou sporulujúcich východiskových kultúr, prípadne vegetatívne pomnožených kultúr haploidných. V oboch prípadoch je prvým predpokladom dostatočne vysoká sporulačná aktivita a vitalita askospor.

Úpravou Fowellovej (1952) acetátovej techniky, spočívajúcej v používaní fyziologického roztoku ako suspendačného média, dosahujeme u nášho kmeňového materiálu zväčša 50 až 80% sporuláciu. Dôležitým momentom je potom izolácia spór z askov, ktorá bez predchádzajúcej úpravy býva i pri mikromanipulačnej technike často prakticky nemožná. V tomto smere sa dobre osvedčuje celuláza, ktorú možno pomerne jednoduchou technikou získavať vo forme žalúdočnej šťavy slimáka záhradného (*Helix pomatia*) (Johnston J. Bact. [1959]). Pre hybridizačné účely ju u nás začala s úspechom používať Podstavková na Genetickom ústave Prírodovedeckej fakulty v Bratislave. Nedostatok celulázy sme určitý čas s dobrými výsledkami nahradzovali enzymatickým prípravkom Spofy — orenzymom, ktorý však pomerne rýchlo stráca aktivitu a práca s ním je teda málo spoľahlivá. Takisto pri slimáčej žalúdočnej šťave je dôležitý vhodný spôsob konzervácie, aby sa neporušila enzymatická aktivita a tu sa podľa skúseností pracovníkov Biologického ústavu ČSAV najlepšie osvedčuje sušenie lyofilizáciou. Enzymatické natravovanie stien askov možno s výhodou aplikovať predovšetkým pre mikromanipulačnú metódu. Je však predpoklad, že pri vhodnej časovej aplikácii, ktorú treba vyskúšať pre každý kmeňový materiál individuálne, by bola dobre použiteľná i pri hromadnej hybridizácii. Tu by bolo

asi osožné kombinovať ju s bežne používaným mechanickým rozrušovaním askov.

Obe uvedené metódy hybridizácie, teda individuálna i masová majú svoje výhody i nevýhody. Pri individuálnej hybridizácii mikromanipulačnou cestou je nedocniteľnou výhodou možnosť ustavičnej kontroly procesu, no na druhej strane technická a časová náročnosť tohto postupu ho robí často nevýhodným. Naproti tomu technicky prístupná a časovo úsporná metóda masovej hybridizácie by konkrétne pre naše šľachtiteľské ciele, kde nám ide viac o kvantitatívne ako o kvalitatívne zmeny šľachteného materiálu, nutne vyžadovala markovacie gény u východiskového materiálu.

Mutácie, či už génové (zmeny veľmi malých úsekov dedičnej hmoty), chromozomové (zmeny úsekov chromozomov) alebo genomové (zmeny počtu chromozomov) možno vyvolávať chemickými (dusíkatý yperit, gáfor a i.) alebo fyzikálnymi (UV-lúče, X-lúče a i.) mutagénmi. U kvasiniek sa podľa doterajších skúseností z chemických mutagénov najlepšie osvedčuje gáfor, a to i pri indukcií polyploidie a z fyzikálnych pre rovnaké účely UV-žiarenie. Je veľmi pravdepodobné, že pre rýchle získavanie nového kmeňového materiálu u kvasiniek, a to u všetkých, ktoré sú schopné vytvárať haploidnú fázu, bude veľmi vhodným postupom kombinovanie indukcie mutácií s hybridizáciou vybraných mutantov. Tento postup sa môže zvlášť dobre uplatniť u mnohých typov kvasiniek rodu *Candida* i *Torulopsis*, s haploidným stavom v priebehu celej ontogeny (individuálneho vývojového cyklu), kde odpadne izolácia monosporických kultúr).

Popri zhruba popísanom získavaní nových kmeňov má šľachtiteľská práca ešte ďalšiu a technicky azda náročnejšiu etapu, a to je testovanie šľachtiteľských vlastností. Už bolo spomenuté, že konkrétne v našej práci nám ide zväčša o hodnotenie kvantitatívnych rozdielov medzi východiskovým a šľachteným materiálom, pričom ide o stupňovanie sa týchto rozdielov. U pekárskych kvasiniek, popri kontrole produkčnej schopnosti, je to predovšetkým testovanie kvasivej mohutnosti na cukroch, hlavne na maltóze a sacharóze. Metód pre tento účel je mnoho, žiaľ zväčša majú podstatnú tienistú stránku v tom, že sú zdĺhavé a prakticky naprosto nepoužiteľné pre sériové analýzy. Pre veľmi hrubú orientáciu nám do určitej miery slúži v mnohých prípadoch priekazný korelačný vzťah medzi tvarom buniek a aktivitou na maltóze v tom zmysle, že u kmeňov s variabilným avšak prevažne pretiahlym tvarom buniek je skvasovanie maltózy podstatne slabšie ako u kmeňov s tvarove vyrovnanými guľatými až oválnymi bunkami.

Rovnaké problémy budú pri testovaní všetkých ostatných sledovaných vlastností, a to nielen u pekárskych kvasiniek, ale u všetkých typov, pri ktorých budú kritériom kvantitatívne znaky. U kvasinkovitých mikroorganizmov pre krmovinárske účely budú v prvej etape šľachtenia na produkciu aminokyselín postačujúce rozbor spektra produkcie, no postupne bude treba prikročiť k zvyšovaniu jednotlivých produkcií a tu budeme opäť narážať

na podobné problémy ako dnes v oblasti skvasovania cukrov u kvasiniek pekárskych.

Ako vyplýva z uvedeného stručného rozboru situácie a možností šľachtenia kvasiniek u nás, sme vskutku ešte celkom na začiatku tejto cesty zvyšovania produktivity príslušných priemyselných výrobov a azda najdôležitejšou otázkou, s ktorou sa bude treba vysporiadať v prvom rade, bude popri metodických ťažkostiach otázka personálneho a materiálneho vybavenia príslušných pracovísk.

Súhrn

Pre kvasinkovité mikroorganizmy možno v procese šľachtenia aplikovať prakticky všetky metódy používané pri šľachtení vyšších organizmov. Pre cielavedomé získavanie nových produkčných kme-

ňov sa zatiaľ najlepšie osvedčuje hybridizácia, prípadne mutagenéza. V príspevku sa rozoberá hlavne technika hybridizácie a spôsoby získavania nových kmeňov touto cestou s poznámkami z vlastných pracovných skúseností. Stručne sú diskutované i metódy testovania kvality kmeňov vzhľadom na výrobné ciele.

Literatúra

- [1] Fowell R. R.: Sodium Acetate Agar as a Sporulation Medium for Yeast, *Nature* 170,587 (1952).
- [2] Johnston J., Mortimer R.: *J. Bact.* 78, 2, 292 (1959).
- [3] Rabanová L., Stuehlík V.: Sporulačná schopnosť niektorých typov pekárskych kvasiniek a jej reakcia na podmienky kultivácie. *Biológia* XVI, 9, 661 (1961).
- [4] Šatava J.: O redukovaných formách kvasiniek, Praha 1918.
- [5] Winge O., Roberts C.: *Yeast Genetics, The Chemistry and Biology of Yeasts*. New York 1958, Edit. by Cook A. H.

Došlo do redakcie 12. 7. 1962.

ВОЗМОЖНОСТИ УЛУЧШЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ

В статье рассматриваются возможности улучшения некоторых штаммов дрожжей, имеющих важное значение для промышленности. Автор сосредоточивает внимание на нормальные генетические методы, в первую очередь на технику гибридизации. Подробно рассматриваются вопросы определения свойств и качества новых штаммов с точки зрения требований промышленного производства.

DIE MÖGLICHKEIT DER ZÜCHTUNG EINIGER HEFETYPEN

Es wird eine Übersicht gegeben über die Möglichkeit der Züchtung technisch wichtiger Hefen bei Anwendung üblicher genetischer Methoden. Es wird vor Allem die Hybridisations-technik und die Methoden zur Untersuchung der Qualität der neugezüchteten Stämme vom Standpunkt der Eignung dieser Stämme für Produktionsziele erörtert.

PRACTICAL POSSIBILITIES TO IMPROVE SOME YEAST STRAINS

The article deals with practical possibilities of improving some strains of yeast, important for fermenting industries, by applying normal genetic methods. The author concentrates his attention to the hybridization technique and to testing methods verifying the quality of new strains by comparing it with standards required in industry.