

## K problému sporulace *Saccharomyces carlsbergensis*

VĚRA KURZOVÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

582.282.232

Při výběru a hledání kvasničných kmenů s určitými žádanými znaky je možný v zásadě dvojitý postup: buď lze sledovat homogenitu jednotlivých kmenů a pasivním výběrem jednotlivých izolátů získat izolát s hledanými vlastnostmi, anebo vyvolat genetickou změnu dědičného aparátu kvasničné buňky (mutace, hybridizace). Zatímco první způsob, tj. pasivní výběr, není alespoň po stránce metodické nesnadnou záležitostí, druhý způsob, tj. změny dědičných vlastností různými genetickými zásahy, je oblast rozsáhlá a metodicky často velmi obtížná. Před vlastními genetickými zásahy je přede nutno vyřešit některé dílčí problémy, které speciálně u rodu *Saccharomyces carlsbergensis* tyto genetické práce ztěžují (např. sporulace).

Nejobtížnějším úsekem a z hlediska vývoje a znalostí moderní genetiky nejméně úspěchů bylo dosaženo pracemi vedoucími k řízenému vyvolání dědičných změn. Lze totiž těžko předpokládat, že náhodně zvolenými mutageny a pracovním postupem se dosáhnou změny námi žádané vlastnosti; to vyžaduje hlubší genetické studie kvasničných kmenů, bez kterých tyto dědičné změny nelze vyvolat. Prvorádý význam při těchto pracích má především propracování metod, které by později umožnily získat nové kvasničné kmeny zásahem do genetického aparátu buňky, např. hybridizací. Hybridizací rozumíme proces spájení jedinců s odlišnými genetickými vlohami, takže lze tímto procesem získat nového jedince, u něhož jsou některé znaky zesíleny, popř. zeslabeny. Metody hybridizace jsou různé, avšak prvním předpokladem pro jejich uskutečnění je vytváření spor jednotlivých kvasničných kmenů. Protože je všeobecně známo, že pivovarské kvasinky rodu *S. carlsbergensis* v provozních podmínkách prakticky nesporelují a v laboratorních podmínkách vytvářejí spory velmi zřídka, a že získané spory velmi neochotně klíčí a spájejí se, obrátili jsme naši pozornost právě k tomuto tématu.

### 1. Sporulace kvasinek

Použité kmeny *S. carlsbergensis*: Smíchov R  
Smíchov H  
Smíchov A  
Plzeň P  
Plzeň H sbírkové  
Plzeň G kmeny  
Plzeň B 26 VÚPS  
Holešovice C  
Holešovice B  
Budvar  
Bratislava  
Braník

Jako srovnávacího kmene se použilo kmene *S. carlsbergensis* 52/323 [1] od Dr. Sedlářové (Chem. ústav SAV), který poměrně snadno sporuluje. Byly vyzkoušeny v zásadě tři sporulační metody: sporulace na sádrovém kavalku a sporulace na dvou modifikacích acetátového agaru [4].

#### Sádrové kavalky:

100 g sádry  
110 ml vody  
24 h se suší při 60 °C

#### 1. Modifikace acetátového agaru:

octan draselný	10 g
kvasičný extrakt	2,5 g
glukóza	1,0 g
agar	30 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

#### 2. Modifikace acetátového agaru:

octan sodný	5,0 g
agar	15,0 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

#### Pracovní postup:

- a) předkultivace všech kmenů na mladině 10 % hmot. při 25 °C;
- b) přeočkování na sporulační půdy, kultivace při 26 °C;
- c) mikroskopická kontrola po 7, 14 a 21 dnech.

Výsledky sporulačních zkoušek jsou uvedeny v tabulce 1.

Jak uvádí ve své práci *Fowell* [2], může být dosaženo zvýšení sporulace opakovaným přeočkováním kvasinek na sporulační médium. Za tímto účelem byly sledované kvasničné kultury po 14 dnech kultivace na obou acetátových agarech opět přeočovány na totéž čerstvé sporulační médium. Po 9 dnech kultivace opět při 26 °C se kultury mikroskopovaly. Ani u jednoho kmene se nezjistilo žádné zvýšení sporulace proti kulturám z první kultivace na sporulačním médiu po 21 dnech kultivace.

Celkově je k této části práce možno říci, že kontrolní kmen *S. carlsbergensis* 52/323/1 sporuluje velmi dobře na všech třech zkoušených sporulačních půdách, po 21 dnech kultivace je dosaženo téměř 100% sporulace, přitom kultura obsahuje buňky s 1, 2, 3 i 4 sporama. U dalších sledovaných kmenů je sporulace velmi slabá a ani po delší kultivaci se počet buněk, obsahujících spory, nezvyšuje. Pokud se týče volby sporulačního média, lze pro jednoduchost přípravy doporučit obě modifikace acetátového agaru proti běžně používaným sádrovým kavalkům. Rozdíly mezi tvorbou spor na obou modifikacích acetátového agaru nepovažujeme za průkazné. Rovněž podle údajů a výsledků z literatury je možno považovat obě média za rovnocenná [4].

Mezi jednotlivými sledovanými kmeny nebyl zjištěn podstatný rozdíl, jak co do počtu buněk tvořících spory, tak co do počtu spor v jednotlivých ascích. Je možno říci, že zcela negativních výsledků bylo dosaženo u obou holešovických kmenů, čtyřsporové asky se vyskytovaly zcela jednotlivě pouze u kmene Bratislava, ostatní kmeny vytvářely menší množství buněk s jednou nebo dvěma sporama. Tyto výsledky naznačují, že při hlubším propracování a event. vhodném zkombinování různých

Tabulka 1

Porovnání tří sporulačních metod

Kmen	Sádrové kavalky 7 dnů	Sádrové kavalky 14 dnů	Acetátový agar 1. modifikace 14 dnů	Acetátový agar 1. modifikace 21 dnů	Acetátový agar 2. modifikace 14 dnů	Acetátový agar 2. modifikace 21. dnů
323	1/3 buněk sporuluje	2, 3, 4sporové buňky	1, 2, 3, 4sporové buňky	1, 2, 3, 4sporové buňky, téměř 100% sporulace	1, 2, 3, 4sporové buňky	1, 1, 3, 3sporové buňky, téměř 100% sporulace
PG	0	ojediněle 1, 2sporové buňky	ojediněle 2sporové buňky	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1, 2sporové buňky
PP	0	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1, 2sporové buňky	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1, 2sporové buňky
B 26	0	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1, 2sporové buňky	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1, 2sporové buňky
PH	0	0	0	ojediněle 1, 2sporové buňky	0	ojediněle 1, 2sporové buňky
Budvar	0	ojediněle 1, 3sporové buňky	0	0	0	ojediněle 1sporové buňky
Bratislava	0	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1, 4sporové buňky	ojediněle 1, 2, 4sporové buňky	0	ojediněle 1 sporové buňky
Braník	0	ojediněle 1, 2sporové buňky	ojediněle	ojediněle	0 1sporové buňky	ojediněle 1sporové buňky
Holešovice B	0	ojediněle 1, 2sporové buňky	0	0	0	0
Holešovice C	0	0	0	0	0	0
Smíchov A	0	ojediněle 1sporové buňky	0	0	ojediněle 4sporové buňky	ojediněle 1sporové buňky
Smíchov H	0	ojediněle 1, 2sporové buňky	0	ojediněle 1sporové buňky	0	ojediněle 1sporové buňky
Smíchov R	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1, 2sporové buňky	0	ojediněle 1, 2sporové buňky	ojediněle 1sporové buňky	ojediněle 1, 2sporové buňky

ných sporulačních metod, by bylo možno u našich kmenů spodních pivovarských kvasinek sporulace dosáhnout, popř. očekávat i zvýšení počtu sporulujících buněk.

## 2. Barvení kvasničných spor

Souběžně se sporulačními zkouškami jsme hledali takovou techniku barvení kvasničných spor, která by umožnila bezpečné rozeznání a počet spor od ostatních partikulí buněčné plazmy. Přezkoušely se celkem známé i námi modifikované metody barvení spor podle *Dornera*, *Wirtze*, *Möllera*, *Czaplewského*, *Shimwella*. Pracovalo se s kmenem *S. carlsbergensis* 52/323/1, který dobře sporuluje. Největší překážkou při barvení kvasinek je vysoká citlivost buněk i k sebešetnější fixaci. Buňky se smršťují,

struktura plazmy a spor je špatně viditelná. Nejvhodnějším postupem se ukázaly metody, používající jako barvicí agens malachitovou zeleň, tj. *Wirtzova* metoda s fixací na podložním sklíčku nebo *Shimwellova* metoda, používající fixaci tepelnou [8].

### *Wirtzova metoda:*

Na podložním skle se smísí kvasničná suspenze s fixačním roztokem sublimátu. Po zaschnutí se takto fixovaný preparát barví 15 vteřin 5% roztokem malachitové zeleni, opláchne se vodou a mikroskopuje. Kvasničné spory jsou zelené.

### *Shimwellova metoda:*

Kvasničný nátěr na podložním sklíčku se krátce fixuje nad plamenem. Poté se preparát barví 1 až



3 minuty 5% vodným roztokem malachitové zeleni při několikerém zahřátí až k odpaření. Dále se preparát ponoří na 30 vteřin do absolutního alkoholu a pak se několik vteřin barví 0,5% vodným roztokem safraninu.

### 3. Vliv lyzinu a manganatých iontů na sporulaci kvasinek

Všeobecně známá zkušenost, že pivovarské kvasinky rodu *S. carlsbergensis* velmi neochotně vytvářejí spory a pokud se spory vytvoří, špatně se z asků uvolňují, vedla mnohé autory ke hledání cesty, jak tento nepříznivý jev odstranit. Byla sledována látková výměna sporulujících kvasinek, zejména pak stimulace a inhibice tvorby spor a růstu buněk vlivem různých dusíkatých sloučenin, stopových prvků apod. [5, 7].

Z řady doporučených dusíkatých sloučenin jsme vyzkoušeli vliv lyzinu a manganatých iontů na sporulaci kvasinek, a to tak, že k agarovému médiu byl přidán lyzin a  $MnSO_4$ . Pracovali jsme s kmenem spodních pivovarských kvasinek Budvar na těchto 4 médiích:

1. A — acetátový agar;
2. AL — acetátový agar s 0,01 M lyzinu; 0,01 %  $MnSO_4$ ;
3. ALM — acetátový agar s 0,01 M lyzinu a
4. AM — acetátový agar s 0,01 %  $MnSO_4$ .

Koncentrace lyzinu podle údaje *Millera* [5], koncentrace  $MnSO_4$  volena namátkově.

Dvoudenní kultura kmene Budvar na mladině se po promytí Ringerovým roztokem zaočkovala na povrch misek s A, AL, ALM, AM agarem. Následovala kultivace při 25 °C. Vývoj spor se sledoval mikroskopicky po 10, 21, 33 dnech. Po 10 dnech kultivace nebyl v počtu buněk, tvořících spory na jednotlivých médiích žádný rozdíl, spory byly za-

znamenány pouze ojediněle. Po 21denní kultivaci bylo možno pozorovat mírné zvýšení počtu sporulujících buněk na AM a ALM médiu. Zajímavý výsledek byl zaznamenán po 33denní kultivaci. Při mikroskopické prohlídce jsme v kultuře rostlé na médiu ALM pozorovali větší počet malých kulatých tělísek, která svou velikostí odpovídala kvasničným sporám a rovněž barvením malachitovou zelení se tělíska barvila zeleně. Tato kultura se převedla do sladiny a po 3 dnech kultivace při 25 °C byly při mikroskopickém vyšetřování kultury přítomny pouze dorostlé a pučící kvasničné buňky normální velikosti. Malá kulovitá tělíska se nyní v preparátu nevyskytovala, tudíž se zřejmě nejednalo o infekci a lze předpokládat, že tato tělíska by mohly být uvolněné kvasničné spory, které kultivací na sladince vyklíčily v normální kvasničné buňky. Potvrdil by se tím i poznatek *Millera* [5] o vhodnosti využití lyzinu a manganatých iontů jako stimulatoru sporulace u kvasinek.

Závěrem je nutno říci, že tyto výsledky považujeme pouze za okrajový námět ukazující vhodnost delšího a hlubšího výzkumu této oblasti metabolismu kvasinek.

### Literatura

- [1] Emeis, C. C.: Untersuchungen an durch Massenisolierung gewonnenen Sporen von *Sacch. carlsbergensis*. = „Wiss. Beilage“, 11, 1958: 180.
- [2] Powell, R. A.: „Nature“, 170, 1952: 578, cit. „Brew. D.“, January 1963: 45.
- [3] Kocková, A.: Kvasinky, Bratislava 1957.
- [4] Lindgren, C. C.: Yeast Genetics 1962, = „Brew. D.“, January 1963: 45.
- [5] Miller, J.: Der Stoffwechsel der Hefesporulierung. = „Brauwiss.“, 9, 1964: 358.
- [6] Oeser, H. - Windisch, S.: Genetische Untersuchung an untergärigen Bierhefen. = „Monatsschr. f. Br.“, 16, 1963: 1937.
- [7] Pontefract, R. D. - Miller, J.: Der Stoffwechsel bei der Sporenbildung von Hefe. = „Brauwiss.“, 8, 1963: 502.
- [8] Shimwell, F.: Färbemethoden. = „Brauwiss.“, 7, 1962: 269.
- [9] Windisch, S.: Sporenisolations-Methode-Genetische Hefeanalyse. = „Wall. Lab. Comm.“, 24, 1961: 253.

Došlo do redakce 24. 1. 1968.

### ZU DEM PROBLEM DER SPORULATION DER *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS*

In dem Artikel werden drei Sporulationsmethoden und einige Methoden der Hefesporenfärbung verglichen. Als geeignetste von den Sporulationsmethoden zeigte sich die Sporulation auf Azetatagar, von den Färbungsverfahren die Methode, die mit Malachitgrün arbeitet. Es wurde weiter der Einfluss des Lysins und der Mangan-Ionen auf die Hefesporulation verfolgt. Die Versuche führten zu der Voraussetzung, dass die erwähnten Faktoren als Stimulatoren der Sporulation zur Geltung kommen können.

### SPORULATION OF YEAST OF *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS* FAMILY

The article deals with three methods which are used to stimulate sporulation, as well as with several methods developed for dyeing yeast spores. The best results have been achieved with sporulation on acetate agar and with malachite green as dyestuff. The influence of lysine and manganate ions upon yeast sporulation is discussed, too, since these chemicals may prove as efficient sporulation stimulants.

### К ВОПРОСУ СПОРООБРАЗОВАНИЯ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS*

В статье сравниваются три разных метода стимулирования спорообразования у дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis* а также разные способы окраски дрожжевых спор. Наиболее эффективным является метод спорообразования на ацетатом агаре и окраски малахитовой зеленой. Рассматривается влияние лизина и ионов мanganатов на спорообразование. Можно предполагать, что эти химикаты будут эффективными стимуляторами.