

## Genetické manipulace s pivovarskými kvasinkami

663.12

Prof. Dr. OLGA BENDOŤÁ, DrSc., Přírodovědecká fakulta UK, Praha, katedra genetiky, mikrobiologie a biofyziky

Proces kvašení představuje jednu z nejdůležitějších fází výroby piva. Jeho úspěšný průběh předpokládá nejen správné složení mladiny, obsah kyslíku při zakvašení a optimální teplotu vedení procesu, ale i používání vhodných kmenů pivovarských kvasinek.

Od kmenů spodních kvasinek, u nás všeobecně používaných se požaduje, aby v potřebné míře prokvašovaly mladinu, aby koncem hlavního kvašení flokulovaly a sedimentovaly na dně kvasné nádoby a aby vyrobené pivo mělo dobrou chuť a vůni odpovídající danému typu.

Je však známo, že mezi kmeny pivovarských kvasinek existují rozdíly někdy obtížně postižitelné, v jejichž důsledku jsou některé kmeny více, jiné méně vhodné pro různé provozní podmínky či pro výrobu určitého typu piva. Z tohoto hlediska je třeba přistupovat k jejich výběru pro praktické použití, a to zejména tam, kde se požadují kmeny pro kvašení mladiny s vysokým obsahem netradičních surovin či s vysokou koncentrací cukru nebo naopak pro výrobu pív nízkokalorických nebo speciálních pív pro diabetiky. V těchto případech zpravidla nelze kontrolovat činnost kvasinek pouze změnou technologických parametrů, ale je třeba pracovat s kmeny se změněným genetickým vybavením.

Změna genomu u kvasinek může obecně nastat mutací spontánní či indukovanou, mitotickou rekombinací, hybridizací kvasinek sexuální či somatickou a transformací.

Spontánní mutace se vyskytují pouze ve velmi nízké frekvenci ( $10^{-6}$  až  $10^{-10}$ ), a proto je pro získávání perspektivních kmenů prakticky nelze využít. Určitou možnost v tomto směru představuje aplikace zkušeností z kontinuálních kultivací. Například *Francis a Hansche* [1] získali v průtokové kultuře mutanty *Saccharomyces cerevisiae* s vyšší aktivitou kyselé fosfatasy. U pivovarských kvasinek však dosud možnost izolovat mutanty s vyšší kvasnou schopností z kultur vedených kontinuálně za vhodných podmínek nebyla experimentálně ověřena.

Indukované mutace po působení mutagenních činidel (např. UV-záření, nitrosoguanidin, etylmetansulfonát aj.) na populaci vznikají s vyšší frekvencí, čímž se zvyšuje pravděpodobnost izolace mutantů požadovaného typu. Například indukované mutanty pivovarských kvasinek s různou flokulační schopností, tvorbou sirovodíku a diacetylu izoloval ve Velké Británii *Molzahn* [2, 3]. Také belgičtí autoři *Ramos-Jeunehomme a Masschelein* [4] získali indukované mutanty, u nichž byla blokována tvorba  $\alpha$ -acetalaktátu a  $\alpha$ -acetohydroxybutyrátu, prekursorů diacetylu a 2,3-pentadionu. Tyto nepochybně z hlediska složení těkavých látek zajímavé mutanty však nebyly stálé.

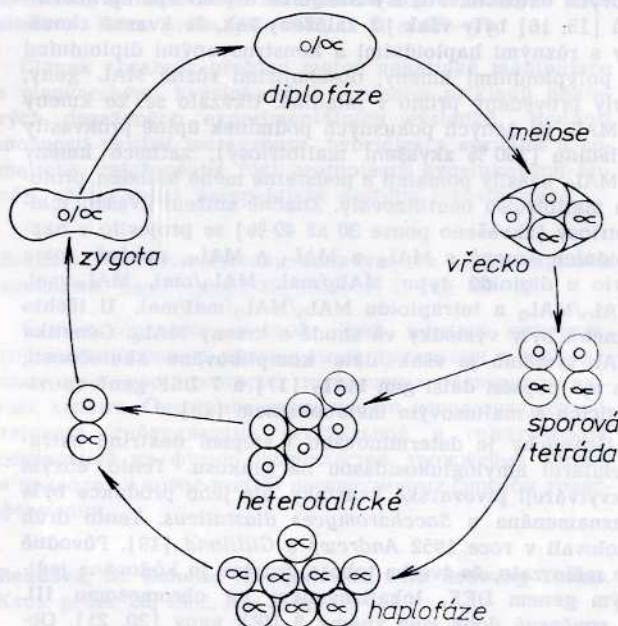
Indukce mutantů u běžně používaných triploidních až polyploidních kmenů pivovarských kvasinek jsou problematické a nelze očekávat mnoho úspěchů.

Při vyhledávání vhodných kultur lze však vycházet i z proměnlivosti kmenů, za jejichž hlavní příčinu lze považovat mitotické rekombinace a z nich plynoucí segregace při vegetativním rozmnožování kvasinek.

Změnu vlastností kvasinkové buňky lze dosáhnout hybridizací.

Sexuální hybridizace je založena na střídání haploidní a diploidní fáze životního cyklu kvasinek a na kopulaci jejich životaschopných spor. Střídání obou fází poprvé

popsali v roce 1918 *Kruis a Šatava* [5]. Tento jev však dále vědecky propracoval *Winge* [6]. Prokázal, že kmeny rodu *Saccharomyces* jsou ve vegetativní fázi běžně diploidní. Při sporulaci vznikají haploidní buňky párovacího typu  $a$  nebo  $\alpha$ . Kopulací buněk rozdílného párovacího typu vznikají diploidní zygoty ( $a/\alpha$ ) a z nich diploidní buňky (obr. 1). Kopulace je indikována specifickými párovacími faktory, vznikajícími v buněčné stěně.



Obr. 1. Životní cyklus *Saccharomyces* sp.

Hybridizační studie přispěly k bližšímu poznání genetického řízení flokulace a kvašení.

Názory na genetické řízení flokulace — schopnosti kvasinek shlukovat se ve vločky — zaznamenaly v průběhu doby řadu změn a vědecké studie této vlastnosti přinášejí stále nové poznatky. Postupně byly popsány dominantní geny označené jako  $FLO_1$ ,  $FLO_2$ ,  $FLO_4$ ,  $FLO_5$  a jeden gen recesivní  $flo_3$ . U genu  $FLO_4$  byla uvedena i jeho lokalizace na chromosomu I [7, 8]. V současné době se však na základě experimentálních výsledků prosazuje názor, že geny  $FLO_1$ ,  $FLO_2$ ,  $FLO_4$  a  $FLO_5$  jsou alelické a že tedy existuje pouze jediný gen  $FLO_1$ , lokalizovaný na chromosomu I [9].

Maltosa a maltotriosa jsou hlavními složkami zkvašených cukrů v mladině (maltosa 50 až 55 %, maltotriosa 10 až 14 %), a proto kvasná schopnost pivovarských kvasinek závisí především na náležitém genetickém vybavení, determinujícím tvorbu enzymů, které realizují transport těchto látek do buňky a jejich utilizaci (maltosopermeasa, maltotriosopermeasa,  $\alpha$ -glukosidasa [10]. Metabolismus maltosy a maltotriosy je u *Saccharomyces* kontrolován polymérem genovým systémem MAL, jehož geny jsou lokalizovány na různých chromosomech (tab. 1). Zkvašování maltosy tedy vyžaduje přítomnost alespoň jednoho genu MAL. Expresce těchto genů byla podrobně prostudována [11, 12, 13, 14], avšak výsledky



Tabulka 1. MAL geny u *Saccharomyces* sp.

Geny	Lokalizace chromozómu
MAL 1	chromozóm VII
MAL 2	chromozóm III
MAL 3	nezmapován
MAL 4	chromozóm XI
MAL 5	nezmapován
MAL 6	nezmapován

těchto prací neinformovaly o expresi MAL genů při kvašení mladiny, protože experimenty byly prováděny v semidefinovaném médiu s použitím bezbuněčných kvasinkových extraktů. Pokusy *Stewart*a a jeho spolupracovníků [15, 16] byly však již založeny tak, že kvasné zkoušky s různými haploidními a konstruovanými diploidními a polyploidními kmeny, obsahujícími různé MAL geny, byly provedeny přímo v mladině. Ukázalo se, že kmeny s MAL<sub>6</sub> za daných pokusných podmínek úplně prokvasily mladinu (100 % zkvašení maltotriosy), zatímco kmeny s MAL<sub>1</sub> kvasily pomaleji a podstatně méně hluboko, protože maltotriosu neutilizovaly. Značné snížení kvašení maltotriosy (zkvašeno pouze 30 až 40 %) se projevilo u haploidních kmenů s MAL<sub>2</sub> a MAL<sub>3</sub> a MAL<sub>4</sub>, opačně tomu bylo u diploidů typu MAL<sub>2</sub>/mal, MAL<sub>3</sub>/mal, MAL<sub>4</sub>/mal, MAL<sub>3</sub>/MAL<sub>2</sub> a tetraploidu MAL<sub>3</sub>/MAL<sub>3</sub>/mal/mal. U těchto kmenů byly výsledky ve shodě s kmeny MAL<sub>6</sub>. Genetika MAL systémů je však dále komplikována skutečností, že byl popsán další gen MAL<sub>7</sub> [17] a 7 DSF genů souvisejících s maltosovým metabolismem [18].

Geneticky je determinováno i štěpení dextrinů extracelulární amyloglukosidasou na glukosu. Tento enzym nevytvářejí pivovarské kvasinky, ale jeho produkce byla zaznamenána u *Saccharomyces diastaticus*. Tento druh izolovali v roce 1952 *Andrews* a *Gilliland* [19]. Původně se mělo zato, že tvorba tohoto enzymu je kódována jediným genem DEX, lokalizovaným na chromosomu III. V současné době jsou známy 3 DEX geny [20, 21]. Obdobně popsal *Tamaki* 3 geny STA 1–3 odpovídající za štěpení škrobu u různých kmenů *Saccharomyces diastaticus* [22].

V souvislosti s uvedenými geny je pro výrobu nízkokalorických pív a speciálních pív pro diabetiky velmi zajímavá otázka konstrukce kmenů pivovarských kvasinek, do jejichž genomu by byly vhodnou metodou vneseny DEX geny. Sexuální hybridizace je u pivovarských kvasinek triploidního a polyploidního charakteru velmi obtížná a málo nadějná vzhledem k tomu, že tyto kmeny buď nesporelují či málo sporelují, jejich spory nesnadno kopulují a jsou málo životaschopné. Tyto obtíže se někteří autoři pokusili překonat. Například *Spencer* a spolupracovníci [23] získali hybridy polyploidních kmenů pivovarských kvasinek (respiračně deficientních mutant) s auxotrofními sporelujícími diploidy. Výsledné prototrofní hybridy sporelovaly a měly normální respiraci.

Postup nevyžadující sexuální kopulaci, aplikovatelný dobře u polyploidních kvasinek, je somatická hybridizace na základě fúze sféroplastů či protoplastů buněk. Tato metoda je založena na tom, že kmeny, u nichž má být navozena fúze, se vhodným enzymovým preparátem (nejčastěji ze žaludeční šťávy hlemýžďe — *Helix pomatia*) zbaví částečně nebo úplně buněčné stěny v osmoticky stabilizovaném prostředí (vhodná koncentrace manitolu, sorbitolu, chloridu draselného) a poté se působením fúzogenního činidla (polyetylglykolu) v přítomnosti kalciových iontů indukuje jejich fúze. Vzniklé hybridní sféroplasty i nefúzované sféroplasty revertují v médiu s vyšší koncentrací agarů. Tato metoda byla propracová

vána a je aplikována řadou autorů, mezi nimi je to u nás především *Spoboda* [24] a v MLR *Maraczová, Ferenczy* a *Szipicky* [25, 26].

Oproti klasické metodě sexuální hybridizace, kdy se kopulace vybraných spor sledují mikroskopicky, nelze takto postupovat při fúzi sféroplastů. Selektce hybridů se děje na základě vhodných markerů rodičovských buněk. V řadě případů se pracuje s auxotrofními mutanty. U pivovarských kvasinek, většinou s vyšší ploeditou, se však auxotrofní mutanty nepřipravují snadno, nejsou stále a jsou méně aktivní. Proto se dává přednost mutantům cytoplasmatickým, které vznikají působením mutagenních činidel jako delece mitochondriální DNA. Jedná se o respiračně deficientní mutanty, jejichž fenotyp se projevuje tvorbou malých kolonií na půdě s glukosou, zatímco na půdě s glycerolem nebo laktátem neroste. Dalším typem cytoplasmatických mutant jsou mutanty rezistentní k antibiotikům, jako je chloramfenikol nebo erythromycin. Ke stejnému účelu lze využít i rezistence k těžkým kovům. Cytoplasmatických mutant používali při svých pokusech o konstrukci kmenů schopných štěpit dextriny *Spencer* [27] a *Russell* [28] a jejich spolupracovníci, zatímco *Emels* [29], *Tubb* [30] a *Žukova* [31] konali pokusy se stejným cílem, založené na sexuální hybridizaci. Jako cytoplasmatický marker byla použita i přirozená citlivost kvasinek ke killer-toxinu, uvolňovanému do média některými kvasinkovými kmeny (killer-kvasinky), který usmrcuje buňky senzitivních kmenů. V tomto případě šlo o transmissi killerové determinanty do senzitivních kvasinek na základě fúze protoplastů rodičovských buněk [32].

Další možností, jak měnit genom kvasinek, je transformace, která v současném rozvoji genového inženýrství zaujímá významné místo. Během tohoto procesu se přenáší DNA z donorového kmene do recipientního.

První pokusy o transformaci prováděl v 60. letech *Oppenoorth* [33, 34] při přenosu schopnosti zkvašovat sacharosou u různých kmenů *Saccharomyces* apod. O správnosti jeho výsledků byly vysloveny pochybnosti, protože se nepodařilo je reprodukovat. Později však práce *Khana* a *Sena* [36] potvrdily možnost transformací u řady kmenů různých druhů rodů *Saccharomyces*, *Hansenula* a *Candida* pro přenos různých výživových vlastností. V nedávné době byla uveřejněna řada experimentálních výsledků, prováděných transformací. Postup má některé znaky společné s fúzí sféroplastů. Záleží v tom, že extrahovaná a purifikovaná DNA se inkubuje se sféroplasty recipientního kmene v přítomnosti polyetylglykolu a vápenatých iontů. Po promytí se sféroplasty ponechají revertovat v osmoticky stabilizovaném agarovém médiu na buňky, které se dále rozmnožují za vzniku kolonií transformovaného kmene. *Barney* a spolupracovníci [9] přenesli takto genetickou informaci pro flokulenci a současně pro syntézu adeninu, *Stewart* a *Russell* [36] pro zkvašování maltotriosy do maltotriosonegativního kmene. Tato transformace vedla k zajímavému zjištění, že genetická informace pro zkvašování maltotriosy je v transformantu lokalizována v cytoplasmě a nikoli v jádře, jak je tomu u donorového kmene.

Transformace představuje postup, který překonává nespecifičnost fúzí, zejména tehdy, přenáší-li se pouze určitý úsek DNA, zatímco při fúzi sféroplastů jde při běžném provedení prakticky o přenos celého genomu. Aplikace plasmidových vektorových systémů představuje pokrok v porovnání s transformací pomocí nativní DNA. Jde o zavádění techniky rekombinace in vitro, která je založena na štěpení molekuly DNA působením restričních endonukleas na fragmenty obsahující specifické sekvence nukleotidů. Tyto fragmenty se in vitro naváží na vektor-plasmid. Vzniklá rekombinantní molekula (chi-



méra) je vnesena do recipientní buňky. Úspěšné transformace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* s použitím plasmidů jako vektorů provedli v nedávné době Beggs [37] a Hinnen [38]. Také Stewart a spolupracovníci [39] se zaměřují v současné době na aplikaci této techniky pro konstrukci nových kmenů pivovarských kvasinek. K tomuto účelu vyšetřovali u řady kmenů přítomnost, izolaci a purifikaci kruhové 2  $\mu$ m plasmidové DNA, která je jedním z možných použitelných vektorů [40, 41]. Je tedy nesporné, že uvedená technika otevírá další cesty výzkumu.

Souhrnně lze konstatovat, že fúze sféroplastů a transformace umožňují genetickou manipulaci s kmeny pivovarských kvasinek. Fúze je však technika s omezenou možností kontroly vznikajícího genotypu. Transformace lze v současné době pro konstrukci nových kmenů kvasinek považovat za metodu s větší nadějí na úspěch. Její zvládnutí a zejména konečné výsledky její aplikace si však vyžadají ještě velmi mnoho experimentálního úsilí.

#### Literatura

- [1] FRANCIS, J. C. - HANSCH, P. E.: *Genetics* **70**, 1972, s. 59
- [2] MOLZAHN, S. W.: *Brew. Guard*, July, 1977, s. 33
- [3] MOLZAHN, S. W.: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* 1977, s. 54
- [4] RAMOS-JEUNEHOMME, C. - MASSCHELEIN, C. A.: *Proc. E. B. C. Conv.* 1977, s. 267
- [5] KRUIS, K. - ŠATAVA, J.: *O redukováných formách kvasinek*, Praha, 1918
- [6] WINGE, O.: *Comptes Rendus Lab. Carlsberg, Sér. Physiologique* **21**, 1935, s. 77
- [7] LEWIS, C. W. - JONSTON, J. R. - MARTIN, P. A.: *J. Inst. Brew.* **82**, 1976, s. 158
- [8] STEWART, G. G. - RUSSELL, I.: *Can. Microbiol.* **23**, 1977, s. 441
- [9] BARNEY, M. C. - JANSEN, G. P. - HELBERT, J. R.: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **38**, 1980, s. 71
- [10] PANCHAL, G. J. - STEWART, G. G.: *The Brewers Digest*, June, 1976, s. 36
- [11] HARRIS, G. - THOMSON, C. C.: *J. Inst. Brew.* **66**, 1980, s. 213
- [12] HALVORSON, H. O. - WINDERMANN, S. - GORMAN, J.: *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 1963, s. 42
- [13] GORTS, C. P. M.: *Antonie van Leeuwenhoek* **33**, 1967, s. 451
- [14] HAUTERA, P. - LORGREN, T.: *Inst. Brew.* **81**, 1975, s. 309
- [15] STEWART, G. G. - GORING, T. E. - RUSSELL, I.: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **33**, 1975, s. 137
- [16] STEWART, G. G. - GORING, T. E. - RUSSELL, I.: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, **35**, 1977, s. 168
- [17] NEEDLEMAN, R. B. - FEDEROFF, H. J. - ECCLESHALL, T. R. - BUCHFERER, B.: *J. Biochem.* **17**, 1978, s. 4657
- [18] BARNETT, J. A.: *Adv. Carbb. Chem. Biochem.* **32**, 1976, s. 125
- [19] ANDREWS, J. - GILLILAND, L. B.: *J. Inst. Brew.* **58**, 1952, s. 189
- [20] ERRATT, J. A. - STEWART, G. G.: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **36**, 1978, s. 151
- [21] ERRATT, J. A.: *Abstr. V. Int. Symp. Yeasts*, London, Canada 1980
- [22] TAMAKI, H.: *Mol. Gen. Genet.* **164**, 1978, s. 205
- [23] SPENCER, J. F. T. - SPENCER, D. M.: *J. Inst. Brew.* **83**, 1977, s. 287
- [24] SVOBODA, A.: *J. Gen. Microbiol.* **109**, 1980, s. 167
- [25] MARAZ, A. - FERENCZY, L.: *Mating type protoplast fusion in Saccharomyces cerevisiae*, in: J. F. Peberdy: *Protoplast Applications*, 1979, s. 35
- [26] SIPCZKI, M.: *Current Microbiology* **3**, 1979, s. 37
- [27] SPENCER, J. F. T. - LAND, P. - SPENCER, D. M.: *Proc. Protoplast Symp.*, Szeged, 1979, s. 145
- [28] RUSSELL, I. - STEWART, G. G.: *Inst. Brew.* **85**, 1979, s. 95
- [29] EMEIS, C. C.: *Proc. E. B. C. Conv.*, 1971, s. 58
- [30] TUBB, R. S.: *Abstr. V. Inst. Symp. Yeasts*, Canada, 1980
- [31] ŽUKOVA, A. I.: *Dostiženija v tehnologiji soloda i piva*, Piščevaja promyšlennost, 1980, s. 237
- [32] PŠENIČKA, I. - JANDEROVÁ, B. - BENDOVIÁ, O. - VONDREJS, V.: *Abstr. Inst. Symp. Microb. Overproduction*, Hradec Králové, 1981
- [33] OPPENOORTH, W. F. F.: *Proc. E. B. C. Conv.*, 1959, s. 29
- [34] OPPENOORTH, W. F.: *Nature*, **193**, 1963, s. 706
- [35] KHAN, N. C. - SEN, S. P.: *J. Gen. Microbiol.* **83**, 1974, s. 237
- [36] STEWART, G. G. - RUSSELL, I.: *Proc. E. B. C. Conv.* 1979, s. 475
- [37] BEGGS, J. D.: *Nature* **275**, 1978, s. 104
- [38] HINNEN, A. - HICKS, J. - FINK, G. R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 1978, s. 1929
- [39] STEWART, G. G.: *Abstr. V. Int. Symp. Yeasts*, London, Canada, 1980
- [40] WETTSTEIN, D.: *Proc. E. B. C. Conv.* 1979, s. 587
- [41] TUBB, R. S.: *J. Inst. Brew.* **85**, 1979, s. 286

**Bendová, O.: Genetické manipulace s pivovarskými kvasinkami.** *Kvas. prům.*, **28**, 1982, č. 2, s. 29–31.

Článek obsahuje přehled metod genetické manipulace s pivovarskými kvasinkami s uvedením příkladů některých dosažených experimentálních výsledků. Hodnotí možnosti využití mutagenese, hybridizace sexuální a somatické, založené na fúzi protoplastů kvasinkových buněk, až po velmi perspektivní postupy transformace.

**Бендова, О.: Генетическая манипуляция с пивоварными дрожжами.** *Квас. прум.*, **28**, 1982, № 2, стр. 29–31.

Статья содержит краткий обзор, методов генетической манипуляции с пивоварными дрожжами с приведением примеров некоторых полученных экспериментальных данных. Оценивает возможности использования мутагенеза, гибридизации сексуальной и соматической, основанной на фузии протопластов дрожжевых клеток и приводит в конце весьма перспективные способы трансформации.

**Bendová, O.: Genetic Manipulation with Brewing Yeasts.** *Kvas. prům.* **28**, 1982, No. 2, pp. 29–31.

The paper comprises a review of methods used in genetic manipulation with brewing yeasts including several examples of experimental results achieved. Possibilities of mutagenesis utilization, sexual and somatic hybridization based on a fusion of protoplasts of yeast cells and the very perspective treatments of transformation are evaluated.

**Bendová, O.: Die genetische Manipulation mit den Bierhefen.** *Kvas. prům.* **28**, 1982, No. 2, S. 29–31.

Der Artikel enthält eine Übersicht der Methoden der genetischen Manipulation mit den Bierhefen mit Anführung von Beispielen der erzielten experimentellen Ergebnisse. Es werden die Möglichkeiten der folgenden Manipulationsmethoden ausgewertet: Mutagenese, sexuelle und somatische Hybridisation, die auf der Fusion der Protoplaste der Hefezellen begründet ist, bis zu sehr perspektiven Transformationsverfahren.