Využití kvasinek produkujících amylolytické enzymy a příprava nových kmenů

577.152.321

RNDr. BLANKA JANDEROVÁ, CSc., RNDr. FRANTIŠEK PŮTA, RNDr. PhMr. OLGA BENDOVÁ, DrSc., přírodovědecká fakulta University Karlovy, Praha

Klíčová slova: *kvasinky, hydrolýza škrobu, průmyslová výroba, nové kmeny kvasinek, přenos genů*

Kvasinky s vysokou schopností hydrolyzovat škrob, vybrané při screeningových pokusech v laboratoři, přicházejí v úvahu pro další testování na vhodnost použití při průmyslové výrobě.

K produkci biomasy pro krmné účely se dosud využívají hlavně různé kmeny rodu *Candida*. Pokud je jako substrát použit škrobnatý odpad či surovina, je buď neidříve převeden do utilizovatelné formy (vodou, varem a enzymy) nebo se může aplikovat tzv. Symba proces, při němž se kultivuje současně např. *Endomycopsis fibuligera* a *Candida utilis*. *Endomycopsis fibuligera* roste pomaleji, takže může být udržen v celkové biomase v menším procentu. Lze však postupovat i tak, že se obě kvasinky kultivují postupně po sobě [1].

V úvahu přichází i přímé využití vhodných druhů kvasinek. Vysokých výtěžků při kultivaci na syntetickém médiu se škrobem lze dosáhnout u *Aureobasidium pullulans, Lipomyces kononenkoae, L. starkey, Schwanniomyces castellii* nebo *Endomycopsis fibuligera* [2]. Exkrece amylas však může být ovlivněna rozdílným složením různých přirozených substrátů obsahujících škrob. Při testování několika druhů kvasinek na čtyřech různých přirozených substrátech vykazoval nejlepší parametry pro zpracování škrobnatého média *Schwanniomyces castellii*. Kompletně hydrolyzovaly škrob ve všech médiích také *Schw. alluvius, Schw. occidentalis, Endomycopsis fibuligera, Torulopsis ingeniosa, Pichia burtonii a Lipomyces starkey*. Poslední dva druhy však byly pro průmyslovou výrobu nevhodné — *L. starkey* rostl příliš pomalu, *P. burtonii* byla citlivá ke změnám pH [3]. Pokud by k produkci biomasy byl použit *Saccharomyces cerevisiae (S. diastaticus)*, mohla by tato biomasa sloužit případně i k lidské výživě. V roce 1985 bylo publikováno sdělení o izolaci kmene *S. diastaticus* BRG 530, který vykazoval kromě glukoamylasové aktivity i schopnost štěpit α-1,6 vazby škrobu a utilizoval až 62 % škrobu. Kmen vyšel vítězně z porovnání s *Lipomyces kononenkoae*, který díky produkci tří amylolytických enzymů lépe hydrolyzoval škrob, ovšem výtěžnost biomasy byla nižší a získaná biomasa obsahovala pouze 15 % proteinů (u *S. diastaticus* 41 % proteinů) [4].

Některé kvasinky schopné zpracovávat škrob by mohly být využívány k získávání lipidů. Za tímto účelem byly testovány *Lipomyces starkey, Cryptococcus laurentis, Candida steatolytica* a *Schw. occidentalis*. Nejúčinněji konvertoval škrob v lipidy *L. starkey* [5].

Velmi výhodné by bylo využití odpadních škrobnatých substrátů k výrobě lihu. V experimentech se *Schwanniomyces alluvius* se podařilo dosáhnout až 95 % konverze škrobu na ethanol, přičemž tvorba vedlejších produktů byla zanedbatelná. Ke zpracování škrobu za anaerobních podmínek byla použita kultura narostlá do stacionární fáze aerobně a vykazující tudíž vysokou aktivitu amylolytických enzymů [6]. V jiných experimentech byl porovnáván *Schw. castellii* a *Saccharomyces diastaticus*. V jednorázové kultuře i v imobilizovaném systému se jako lepší jevil *Saccharomyces diastaticus*. Produkoval ethanol i v médiu s vysokou počáteční koncentrací škrobu a byl dostatečně odolný vůči

ethanolu [7]. Byla vyzkoušena i produkce ethanolu ze škrobu směsnou kulturou *Schw. alluvius* a *Saccharomyces uvarum* [8]. Širšímu využití amylolytických kvasinek pro výrobu lihu brání v současné době zejména to, že vysoce výkonné kmeny, pokud jde o hydrolýzu škrobu, bývají zpravidla fermentačně málo výkonné, produkují málo ethanolu a nejsou k němu odolné.

Jak je vidět, využití kvasinek produkujících amylolytické enzymy přímo v průmyslové výrobě naráží na mnohá omezení a mnohé požadavky na průmyslové kmeny. Proto je proces hledání vhodných kmenů dlouhodobý a zahrnuje i snahu o konstrukci nových kmenů, které by splňovaly všechny požadavky. K realizaci těchto záměrů nepostačují klasické metody, ale je třeba využít nových metod buněčného a genového inženýrství.

Značné úsilí bylo doposud věnováno přípravě nových kmenů pro použití v pivovarství a lihovarství. Hybridní pivovarské kmeny *S. cerevisiae* schopné štěpit dextriny v mladině byly získány jak klasickým křížením, tak metodou indukované fúze protoplastů [9, 10, 11, 12]. Dextriny však nebyly odstraněny zcela, zřejmě v důsledku neschopnosti glukoamylasy *S. diastaticus* štěpit α-1,6 vazby polymeru. Proto se vhodnějším donorem příslušného genu zdají být např. kvasinky rodu *Schwanniomyces* nebo *Endomycopsis*, které tuto schopnost mají. Zde však jde o přenos genů mezi odlišnými rody kvasinek, což je záležitost obtížnější. Hybridy získané indukovanou fúzí protoplastů *Saccharomyces uvarum* a *Schwanniomyces occidentalis* vykazovaly sice amylolytickou aktivitu, nedosahovaly však hlubšího prokvašení mladiny než výchozí pivovarský kmen a při dlouhodobější kultivaci v mladině amylolytické schopnosti ztrácely [13].

Byly získány i mezirodové hybridy mezi *S. cerevisiae* a *Schwanniomyces alluvius*, které ovšem spontánně segregovaly do původních auxotrofních typů [14]. Fúze protoplastů *Saccharomyces cerevisiae* a *Schwanniomyces castellii* vedla k vzniku sporulujících hybridů, štěpících škrob, ale neprodukujících α-amylasu. Tyto hybridy nebyly testovány na použití v průmyslu [15]. Kombinace dvou rozdílných genomů však často vede k projevu řady různých vlastností, které se při zkvašování tak komplexního substrátu jako je mladina, projeví nežádoucími chuťovými vlastnostmi vyrobeného piva.

Poněkud jednodušší situace je tehdy, mají-li být hybridní kmeny používány k výrobě lihu. Bylo testováno použití hybridního kmene mezi *Saccharomyces cerevisiae* a *S. diastaticus* pro zpracování kukuřičných zbytků [16]. Hybrid opět nebyl schopen rozštěpit škrob beze zbytku, bylo nutno přidávat preparát izolované plísňové glukoamylasy. Jeho množství však bylo možno snížit o polovinu, což při značných objemech vyráběného lihu znamená podstatné finanční úspory. Proces od přípravy nového kmene až po jeho použití ve výrobě je však i u lihovarských kmenů značně zdlouhavý. Laboratorní testy na definovaných médiích velmi často poskytují odlišné výsledky než testy na přirozených substrátech a proto je třeba provádět zkoušky v provoze a s řadou kmenů. Důvodem rozdílů mohou být např. odlišné flokulační schopnosti různých hybridních klonů, které se projeví při kultivaci na substrátech obsahujících pevné částice [11].

Vnitrodruhová fúze mezi *S. cerevisiae* a *S. diastaticus* byla použita také pro přípravu hybridních kmenů pekařských kvasinek [17] a kvasinek používaných k výrobě whisky [18].

Příprava nových kmenů pomocí genového inženýrství je dosud ve stadiu počátečních experimentů, které však přinášejí cenné poznatky.

Byly izolovány a klonovány STA geny *Saccharomyces diastaticus*. Transformace výchozího kmene *S. diastaticus* plasmidem nesoucím STA1 gen umožnila 5 až 10násobné zvýšení produkce glukoamylasy [19]. Gen byl pomocí plasmidu přenesen i do různých kmenů *S. cerevisiae*, v nichž se exprimoval a produkce enzymu byla opět vyšší než u donorového kmene *S. diastaticus* [19, 20]. Navíc k tvorbě enzymu docházelo i za přítomnosti glukosy v médiu [20]. Pomocí plasmidu se podařilo do různých kmenů *S. cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* přenést také gen pro sporulační glukoamylasu ze *S. diastaticus*. V obou kvasinkách se opět gen exprimoval, produkce enzymu však byla 100× nižší než v *S. diastaticus* [21]. Z vlastního promotoru je v *S. cerevisiae* exprimován i gen glukoamylasy nepříbuzné kvasinky Endomycopsis fibuligera [22], zatímco exprese genu glukoamylasy z kvasinky druhu *Schwanniomyces occidentalis* probíhá jen tehdy, je-li strukturní část genu zařazena pod promotor *S. cerevisiae* [*28*]. Obdobně je tomu i v případě genů glukoamylasy plísní *Aspergillus awamori* [23] a *Rhizopus sp.* [24].

Ve dvou případech se podařilo úspěšně přenést mezi různými druhy kvasinek gen pro α-amylasu: jde o přenos příslušného genu z *Endomycopsis fibuligera* [25] a *Schwanniomyces occidentalis* [28] do *S. cerevisiae*. Byly také získány kmeny *S. cerevisiae* exkretující α-amylasu po transformaci plasmidem nesoucím gen pro α-amylasu z myši [26], pšenice [27], *Bacillus amyloliquefaciens* [29] nebo *Bacillus stearothermophilus* [30]. Přenos genů z takto fylogeneticky vzdálených nebo nepříbuzných organismů však vyžaduje složitější postup, při němž jsou do plasmidu zařazovány fragmenty DNA získané reverzní transkripcí mRNA.

Přenos genů pro amylolytické enzymy poskytuje tedy možnost obohatit stávající průmyslové kmeny o novou vlastnost bez rizika nežádoucího ovlivnění jejich vyhovujících parametrů, dosáhnout zvýšené produkce enzymu, popř. exkrece enzymu nepodléhající obvyklým buněčným regulačním mechanismům. Širšímu využití nově získaných producentů amylolytických enzymů v průmyslové výrobě zatím brání fakt, že při dlouhodobější kultivaci se plasmidy z určitého procenta buněk ztrácejí.

Literatura

[1] SKOGMAN, I. I.: Starch/Stärke, **28**, 1976, s. 278
[2] FEDERICI, F., D'ELIA, M.: Enzyme Microb. Technol., **5**, 1983, s. 225
[3] TOUZI, A., PREBOIS, J. P., MOULIN, G., DESCHAMPS, F., GALZY, P.: Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **15**, 1982, s. 232
[4] OGDEN, K., TUBB, R. S.: Enzyme Microb. Technol., **7**, 1985, s. 220
[5] GUERZONI, M. E., LAMBERTINI, P., LERCKER, G., MARCHETTI, R.: Starch/Stärke, **37**, 1985, s. 52
[6] CALLEJA, G. B., LEVY-RICK, S., LUSENA, C. V., NASIM, A., MORANELLI, F.: Biotechnol. Lett., **4**, 1982, s. 543
[7] AMIN, G., DE MOT, R., VAN DIJCK, K., VERACHTERT, H.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **22**, 1985, s. 237
[8] WILSON, J. J., KHACHATOURIANS, W. M., INGLEDEW, W.: Biotechnol. Lett., **4**, 1982, s. 333
[9] EMEIS, C. C.: Amer. Soc. Brew. Chem. Proc., 1971, s. 58
[10] HOCKNEY, R. C., FREEMAN, R. F.: Proc. 5th Internat. Protoplast Symp., Szeged, Hungary, 1979, s. 139
[11] PANCHAL, C. J., HARBISON, A., RUSSELL, I., STEWART, G. G.: Biotechnol. Lett., **4**, 1982, s. 33
[12] JANDEROVÁ, B., DAVAASURENGIJN, T., VONDREJS, V., BENDOVÁ, O.: J. Basic. Microbiol., **26**, 1986, s. 627
[13] VAN DER SPIEGLE, K., ISERENTANT, D. I.: VI. Symp. Internat. sur Levures, Montpellier, 1984, s. IX-4-P
[14] WILSON, J. J., KHACHATOURIANS, G. G., INGLEDEW, W. M.: Mol. Gen. Genet., **186**, 1982, s. 95
[15] TAMAKI, H.: Curr. Genet., **10**, 1986, s. 491
[16] WHITNEY, G. K., MURRAY, C. R., RUSSELL, I., STEWART, G. G.: Biotechnol. Lett., **7**, 1985, s. 349
[17] SPENCER, D. M., BJAALAND, T., BIZEAU, C., SPENCER, J. F. T.: VI. Symp. Internat. sur Levures, Montpellier, 1984, s. IX-4-6
[18] WATSON, D. C.: Current Developments in Yeast Research, Ed. STEWART, G. G., RUSSELL, I., Pergamon Press, 1981, s. 57
[19] YAMASHITA, I., FUKUI, S.: Agric. Biol. Chem., **47**, 1983, s. 2689
[20] MEADEN, P., OGDEN, K., BUSSEY, H. TUBB, R. S.: Gene, **34**, 1985, s. 325
[21] ERRATT, J. A., NASIM, A.: J. Bacteriol., **166**, 1986, s. 484
[22] YAMASHITA, I., ITOH, T., FUKUI, S.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **23**, 1985, s. 130
[23] INNIS, M. A., HOLLAND, M. J., MC CABE, P. C., COLE, G. E., WITTMAN, V. P., TAL, R., WATT, K. W. K., GELFAND, D. D., HOLLAND, J. P., MEADE, J. H.: Science, **228**, 1985, s. 21
[24] ASHIKARI, T., NAKAMURA, N., TANAKA, Y., KIUCHI, N., SHIBANO, Y., TANAKA, T., AMACHI, T., YOSHIZUMI, H.: Agric. Biol. Chem., **49**, 1985, s. 2521
[25] YAMASHITA, I., ITOH, H., FUKUI, S.: Agric. Biol. Chem., **49**, 1985, s. 3089
[26] THOMSEN, K. K.: Carlsberg Res. Commun., **48**, 1983, s. 545
[27] ROTHSTEIN, S. J., LAZARUS, C. M., SMITH, W. E., BAULCOMBE, D. C., GATENBY, A. A.: Nature, **308**, 1984, s. 662

[28] DOHMEN, R. J., STRASSER, A. W. M., DAHLEMS, U. M., SEEBOTH, P. G., HOLLENBERG, C. P.: Yeast 4 — Special Issue, 1988, s. 145

[29] RUOHONEN, L., HACKMAN, P., LEHTOVAARA, P., KNOWLES, J. K. C., KERANEN, S.: Gene, **59**, 1987, s. 161

[30] NONATO, R. V., SHISHIDO, K.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **152**, 1988, s. 76

Lektoroval Ing. Jan Káš, CSc.

Janderová, B. - Půta, F. - Bendová, O.: Využití kvasinek produkujících amylolytické enzymy a příprava nových kmenů. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 7, s. 208—210.

Článek se zabývá možnostmi využití kvasinek štěpících škrob v průmyslové výrobě (produkce biomasy, lipidů, lihu). Uvedeny jsou dosavadní výsledky snahy o přenos schopnosti produkovat amylolytické enzymy do průmyslových kmenů kvasinek pomocí indukované fúze protoplastů a genového inženýrství.

Яндерова, Б. - Пута, Ф. - Бендова, О.: Использование дрожжей, производящих амилолитические энзимы и получение новых штаммов. Квас. прум., **35**, 1989, № 7, стр. 208—210.

Статья занимается возможностью использования дрожжей, расщепляющих крахмал в промышленном производстве (получение биомассы, липидов, спирта). Приводятся современные результаты стремления к переносу способностей производить амилолитические энзимы в промышленные штаммы дрожжей при помощи индуцированного слияния протопластов и генной инженерии.

Janderová, B. - Půta, F. - Bendová, O.: Utilization of Yeasts Producing Amylolytic Enzymes and Preparations of New Strains. Kvas. prům., **35**, 1989, No. 7, pp. 208—210.

The utilization of starch splitting yeasts on an industrial scale for the production of biomass, lipids and alcohol is discussed. The transfer of the ability to form amylolytic enzymes into production strains of yeasts using the induced protoplast fusion and the genetic engineering are described.

Janderová, B. - Půta, F. - Bendová, O.: Ausnützung von Hefen, die amylolytische Enzyme produzieren, und Aufbereitung neuer Hefestämme. Kvas. prům., **35**, 1989, Nr. 7, S. 208—210.

In dem Artikel befassen sich die Autoren mit den Möglichkeiten der industriellen Ausnützung der stärkespaltenden Hefen (Produktion von Biomasse, Lipiden, Spiritus). Angeführt werden die bisherigen Ergebnisse auf dem Gebiet der Übertragung der Fähigkeit der Produktion amylolytischer Enzyme in die industriellen Stämme mittels der induzierten Protoplasten-Fusion und des Gen-Engineerings.