

# Biotechnologické vlastnosti kvasiniek izolovaných pre potreby sekundárnej fermentácie vína

663.2 663.12 663.252.41

## 4. časť. Genetické vlastnosti izolovaných vínnych kvasiniek

Ing. SOŇA MICHALČÁKOVÁ, doc. Ing. FEDOR MALÍK, CS c., Ing. ERIKA MORVAYOVÁ, RNDr. VALTER VOLLEK, Chemickotechnologická fakulta SVŠT Bratislava

**Kľúčové slová:** vínne kvasinky, sporulačná schopnosť, DNA, rezistencia k antibiotikám, ploidia, zymocidálna aktivita, šumivé víno

Predchádzajúce časti tohto príspevku popisovali technologické a biochemické vlastnosti vínnych kvasiniek, izolovaných na princípe autoselekcie z dokvášajúcich vín juhomoravskej vinohradníckej oblasti. Zámerom práce bolo získať priemyselne zaujímavé kmene kvasiniek, vhodné pre výrobu šumivých vín.

Biochemické a fyziologické vlastnosti mikroorganizmov a z nich vyplývajúce technologické vlastnosti sú v zásade dané ich genetickým vybavením. Preto sme u izolovaných kmeňov študovali i genetické vlastnosti, ktoré tak dotvárajú komplexný obraz charakterizácie experimentálnych populácií vínnych kvasiniek. Pri sledovaní týchto vlastností sme sa zamerali na hodnotenie sporulácie, ploidie, nárokov na rastové látky, schopnosti dýchania a citlivosti na antibiotiká. Napokon sa testovala zymocidálna aktivita.

Poznanie genetických charakteristík je dôležité i z hľadiska ich ďalšieho využitia vo výrobe. Metódy génového inžinierstva poskytujú bohaté možnosti ovplyvňovania génového vybavenia kvasiniek, ktoré smeruje k zlepšovaniu ich vlastností. Pre účely šľachtenia je potrebné vybrať nielen vhodné kmene, ale aj poznať ich dedičné charakteristiky, na základe ktorých by bolo možné jednotlivé kmene získané génovými manipuláciami hodnotiť.

### 4.1 MATERIÁLY A METÓDY

#### 4.1.1 Použité mikroorganizmy

V práci sme použili 10 kmeňov vínnych kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* izolovaných z vín juhomoravskej vinohradníckej oblasti a 7 zbierkových porovnávacích kmeňov vínnych kvasiniek. Charakterizácia vlastností použitých kvasiniek je uvedená v predchádzajúcich častiach tohto príspevku [1, 2]. Ako referenčné kmene pre stanovenie ploidie sa použili haploidný kmeň *S. cerevisiae* IL8-8D a diploidný kmeň *S. cerevisiae* DTXII.

#### 4.1.2 Metódy sledovania genetických vlastností

Sporulačná schopnosť kvasiniek sa sledovala po 7-dňovej kultivácii pri 25 °C vo Fowellovom roztoku mikroskopicky a zisťovala sa frekvencia výskytu jednospórových až štvorspórových askov [3]. Ploidia buniek sa určovala nepriamo na základe obsahu DNA v bunke. Použila sa kultúra kvasiniek vyrastená v kompletnej glukózovej pôde do stacionárnej rastovej fázy. Z buniek sa extrahovala DNA, jej obsah sa stanovil difenylamínovým činidlom a výsledok porovnával s obsahom v štandardných haploidných a diploidných kmeňoch [3].

K sedimentu buniek ( $2 \cdot 10^9$  buniek) sa pridalo 5 ml vychladenej  $\text{HClO}_4$  (1 mol.l<sup>-1</sup>) a po premiešaní inkubovalo 30 minút pri 4 °C v ľadovom kúpeli. Po centrifugácii sa sediment extrahoval 2,5 ml  $\text{HClO}_4$  (1 mol.l<sup>-1</sup>) vo vodnom kúpeli (70 °C) 30 minút. K 2 ml supernatantu sa pridalo 2 ml difenylamínového činidla a 0,1 ml vodného roztoku acetaldehydu (1,66 mg.ml<sup>-1</sup>), zmes sa inkubovala 12 až 15 hodín pri teplote 30 °C a absorbanca roztoku sa zmerala pri 600 nm. Pre zostrojenie kalibračnej krivky sa ako štandard použila DNA spermíí rýb (Serva, NSR) v množstve 0 až 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

Nároky na rastové látky, schopnosť dýchania a citlivosť na antibiotiká sa zisťovala na nasledovných pôdach: pevnej minimálnej (identifikácia auxotrofných mutantov), glycerolovej (respiračne deficitné mutanty nie sú

schopné rásť na nesekvisitálnych substrátoch) a glycerolovej s obsahom antibiotík [erytromycínu (2 mg.ml<sup>-1</sup>), resp. mucidínu (0,5 µg.ml<sup>-1</sup>)] po 3 až 4 dňoch rastu pri 28 °C.

Zymocidálna (smrtiaca, killer) aktivita sa testovala na kompletnej glukózovej pôde s citrát-fosfátovým tlmivým roztokom (pH = 4,5), 0,01 % metylénovou modrou a vrstvou štandardného citlivého (*S. cerevisiae* S6/1), resp. smrtiaceho kmeňa (*S. cerevisiae* T 158/c). Na vrstvu štandardného kmeňa ( $10^5$  buniek) sa testované kmeny naniesli vo forme okrúhleho kolónie a po 48 hodinovej inkubácii pri 22 °C sa vyhodnotila aktivita študovaných kmeňov na základe tvorby zón potlačeného rastu [4]. Smrtiace kvasinky produkujúce toxín vytvárajú jasnú zónu s modrým okrajom.

### 4.2 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Schopnosť vytvárať spóry je dôležitou podmienkou viacerých genetických analýz kvasiniek a má tiež význam z taxonomického hľadiska. Zisťovala sa vo Fowellovom roztoku, do ktorého sme očkovali pripravenú suspenziu kmeňov. Najnižšia sporulačná efektívnosť bola pozorovaná u kmeňa *S. cerevisiae* 3A, a to 5,4 %, najvyššia 57,2 % u kmeňa *S. cerevisiae* 13 RVV (tabuľka 1). Väčšina kmeňov tvorila asky s dvoma až štyrmi spórmi, v menšej miere sa vyskytli asky obsahujúce jednu spóru.

Ploidia kvasiniek je daná počtom súborov chromozómov. Najčastejšie kvasinky bývajú diploidné, t. j. s dvojitým súborom chromozómov 2n [5]. Ploidia sa väčšinou určuje nepriamo testovaním vlastností kvasiniek, ktoré

Tabuľka 1. Sporulačná schopnosť, ploidia buniek, smrtiaca aktivita a rezistencia k antibiotikám študovaných kmeňov kvasiniek.

| Kmeň  | Sporulačná efektívnosť (%) | Obsah DNA v bunke (µg DNA · 10 <sup>-3</sup> buniek) | Ploidia | Zymocidálna aktivita          | Rezistencia k antibiotikám    |
|-------|----------------------------|--|---------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1B    | 25,0                       | 47,9   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>+</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>R</sup> |
| 2A    | 34,3                       | 42,2   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>R</sup> |
| 2C    | 38,4                       | 44,1   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>R</sup> |
| 3A    | 5,4                        | 48,7   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>S</sup> |
| 3B    | 28,3                       | 44,3   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>S</sup> |
| 6A    | 20,0                       | 49,7   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>R</sup> |
| 6C    | 16,5                       | 50,3   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>+</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>R</sup> |
| 11A   | 16,5                       | 43,2   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>S</sup> |
| 11B   | 27,0                       | 42,7   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>R</sup> |
| 11C   | 35,8                       | 47,8   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>+</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>S</sup> |
| DA1   | 16,8                       | 42,1   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>R</sup> |
| FV1   | 31,8                       | 48,3   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>+</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>R</sup> |
| FV2   | 26,8                       | 47,1   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>S</sup> |
| 76/D  | 49,3                       | 52,4   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>S</sup> |
| 74/F  | 15,3                       | 47,9   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>S</sup> |
| 13RVV | 57,2                       | 45,5   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>R</sup> |
| 3MTV  | 20,1                       | 50,8   | 2n      | K <sup>-</sup> R <sup>-</sup> | M <sup>S</sup> P <sup>R</sup> |

Vysvetlivky: K<sup>-</sup>R<sup>-</sup> senzitivný kmeň, K<sup>+</sup>R<sup>+</sup> smrtiaci kmeň, K<sup>-</sup>R<sup>+</sup> neutrálny kmeň  
S- senzitivita, R- rezistencia  
M- mucidin, E- erytromycin



sú v priamom súlade so stupňom ploidie ako sú rozmery buniek a jadier, obsah deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) v bunke, kríženie, a pod. Je známe, že obsah DNA v haploidnom kmeni *S. cerevisiae* (s jedným súborom chromozómov  $n$ ) je 22 až 26  $\cdot 10^{-5}$   $\mu\text{g}$  na bunku, v diploidných kmeňoch  $2n$  by mal byť obsah DNA dvojnásobný, v triploidných trojnásobný, atď. V našich experimentoch sme zisťovali stupeň ploidie na základe obsahu DNA v bunke a porovnali s obsahom v štandardných kmeňoch. Referenčný haploidný kmeň *S. cerevisiae* IL8-8D obsahoval 26,9  $\mu\text{g}$  DNA v  $10^9$  bunkách, diploid *S. cerevisiae* DTXII 48,2  $\mu\text{g}$  v  $10^9$  bunkách. Naše kmene s obsahom DNA v rozmedzí 42 až 52  $\mu\text{g}$  v  $10^9$  bunkách sme určili ako diploidné. Uvedené výsledky sú priemerom z troch stanovení.

Podmienkou úspešnej kultivácie fyziologicky odlišných mikroorganizmov v kultivačnom prostredí je znalosť ich nárokov na prítomnosť nevyhnutných živín a podmienok kultivácie. Z výsledkov testovania izolovaných a porovnávacích kmeňov vyplýva, že všetky študované kmene majú prototrofný charakter a nevyžadujú teda prídavok rastových látok do kultivačného prostredia. Rastom na glycerolovej pôde potvrdili všetky sledované kvasinky charakter dýchajúcich (respiračne kompetentných) kmeňov.

Citlivosť a odolnosť voči antibiotikám patrí k základným dedičným charakteristikám kvasiniek, ktoré možno využiť ako znaky pri selekcii kmeňov s požadovanými vlastnosťami pripravených technikami génových manipulácií. Sledovali sme rezistenciu na antibiotiká erytromycín a mucidín. Z testovaných kmeňov bolo 10 odolných voči erytromycínu a 7 naň citlivých, všetky kmene boli citlivé na prítomnosť mucidínu v pôde.

Smrtiace kvasinky rodu *Saccharomyces* sú charakteristické produkciou extracelulárneho proteínového toxínu, ktorý usmrcuje bunky citlivých kmeňov príbuzného typu [6]. Tieto môžu spôsobiť značné komplikácie pri vedení fermentácie, najmä ak kultúrne kvasinky sú voči nim citlivé. V množstve nad 2 % úplne potlačia rast senzitívnych kmeňov, čo má za následok nedostatočné prekvasenie substrátu a tým aj nízku kvalitu výsledného produktu [7]. Smrtiaca aktivita nebola zistená u žiadneho z testovaných kmeňov kvasiniek. kmene 1B, 6C, 11C a FV1 boli neutrálne, to znamená, že netvorili zóny ani na vrstve citlivého ani na vrstve smrtiaceho kmeňa. Ostatné kmene možno zaradiť medzi citlivé kvasinky.

V predchádzajúcich častiach tohto príspevku bol na základe testovania technologických a biochemických vlastností vybraný kmeň *S. cerevisiae* 6C. Tento kmeň vykazoval výborné technologické, uspokojivé biochemické a štandardné genetické vlastnosti, a preto by mohol byť priemyselne zaujímavý pre výrobu šumivých vín.

#### 4.3 ZÁVER

U 10 kmeňov vinných kvasiniek izolovaných z vín juhomoravskej vinohradníckej oblasti a 7 zbierkových porovnávacích kmeňov sme charakterizovali vybrané genetické vlastnosti. Najvyššia sporulačná efektívnosť bola zistená u kmeňa *S. cerevisiae* 13RVV. Ani jeden kmeň nevyžadoval prídavok rastových látok do kultivačného prostredia, kmene sa výrazne neodlišovali v obsahu DNA v jadre. Žiadny z izolovaných kmeňov nevykazoval smrtiacu aktivitu, 4 zo sledovaných kmeňov boli neutrálne, ostatné možno zaradiť medzi citlivé kmene.

Kmeň vytýpaný pre možné priemyselné využitie pri výrobe šumivých vín *S. cerevisiae* 6C preukázal štandardné genetické vlastnosti a neodlišoval sa výrazne od v technológii sekundárnych fermentácií bežne používaného kmeňa Bratislava 1.

Genetické charakteristiky celého sledovaného súboru kvasiniek dotvárajú komplexný obraz biotechnologických vlastností kmeňov izolovaných z vín juhomoravskej vinohradníckej oblasti.

#### Literatúra

- [1] MALÍK, F., VOLLEK, V., HRONČEK, J., MORVAYOVÁ, E.: Kvas. prům., 35, 1989, s. 141
- [2] MALÍK F., HRONČEK, J., VOLLEK, V., MORVAYOVÁ, E.: Kvas. prům., 35, 1989, s. 171
- [3] NORRIS, J. R., RIBONS, D. W. (eds.): Methods in Microbiology 5B, Academic Press, London, 1971
- [4] WOODS, D. R., BEVAN, E. A.: J. Gen. Microbiol. 51, 1968, s. 115
- [5] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Alfa, Bratislava, 1982
- [6] TIPPER, D. J., BOSTIAN, K. A.: Microbiol. Rev. 48, 1984, s. 125
- [7] BARRE, P.: Bull. O. I. V. 57, 1984, s. 635

Lektoroval doc. Ing. Erich Minárik, DrSc.

**Michalčáková, S. - Malík, F. - Morvayová, E. - Vollek, V.: Biotechnologické vlastnosti kvasiniek izolovaných pre potreby sekundárnej fermentácie vína. 4. časť. Genetické vlastnosti izolovaných vinných kvasiniek.** Kvas. prům., 35, 1989, č. 12, s. 357—358.

U série vinných kvasiniek izolovaných z dokvášajúcich vín juhomoravskej vinohradníckej oblasti sa charakterizovala sporulačná schopnosť, nároky na rastové látky, rezistencia k antibiotikám, ploidia buniek a schopnosť dýchania. Všetky sledované kmene boli prototrofné, dýchajúce, diploidné, s pomerne nízkou sporulačnou schopnosťou, pričom nevykazovali smrtiacu aktivitu.

**Михалчакова, С. - Малик, Ф. - Морвайова, Е. - Воллек В.: Биотехнологические свойства дрожжей, изолированных для потребностей вторичной ферментации вина. 4. часть. Генетические свойства изолированных винных дрожжей.** Квас. прум., 35, 1989, № 12, стр. 357—358.

Для серии винных дрожжей, изолированных из дображивающих вин виноградной области Южной Моравии, были характеризованы способность спорообразования, требования к ростовым веществам, устойчивость в отношении к антибиотикам, плоидия клеток и способность дыхания. Все исследованные штаммы были прототрофные, дышащие, диплоидные, с относительно низкой способностью спорообразования, причем не показывали смертоносную активность.

**Michalčáková, S. - Malík, F. - Morvayová, E. - Vollek, V.: Biotechnologic Properties of Yeasts Isolated for Secondary Fermentation of Wine. Part IV. Genetical Properties of Isolated Wine-Making Yeasts.** Kvas. prům., 35, 1989, No. 12, pp. 357—358.

The spore formation, the necessity of growth factors, the resistance to antibiotics, the cell ploidity and the respiration ability were determined with the yeasts isolated from an after-fermentation of wines from the South Moravia viticulture region. All the observed strains were prototrophic, with respiration and diploidic. Their sporulation ability was low. They have no killing activity.

**Michalčáková, S. - Malík, F. - Morvayová, E. - Vollek, V.: Biotechnologische Eigenschaften der für die Zwecke der sekundären Weinfermentation isolierten Hefen. 4. Teil. Genetische Eigenschaften der isolierten Weihen.** Kvas. prům., 35, 1989, Nr. 12, S. 357—358.

Bei der Weinhefenserie, die aus nachgärenden süd-mährischen Weinen isoliert wurde, wurden folgende charakteristische Parameter bestimmt: Sporulationsfähigkeit, Ansprüche an Wachstumsstoffe, Resistenz gegenüber Antibiotica, Ploidität der Zellen und Atmungs-fähigkeit. Alle verfolgten Stämme waren prototroph, atmend, diploid, mit einer relativ niedrigen Sporulationsfähigkeit, ohne dabei die lethale Aktivität aufzuweisen.