

Šľachtenie vínnych kvasiniek

663.41

II. Výber a základné charakteristiky genofondu

Ing. SOŇA MICHALČÁKOVÁ, doc. Ing. ERNEST ŠTURDÍK, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, 812 37 Bratislava

Ing. PAVOL SULO, CSc., Ústav biotechnológie SVŠT, 812 37 Bratislava

Doc. Ing. ERICH MINÁRIK, DrSc., Komplexný výskumný ústav vinohradnícky a vinársky, 833 11 Bratislava

Kľúčové slová: vínne kvasinky, génové manipulácie, genetické, biochemické a fyziologické znaky kvasiniek, smrtiace kvasinkové kmene

V predošlom článku publikovanom v našom časopise [1] bol charakterizovaný súčasný stav v šľachtení vínnych kvasiniek pomocou klasických i moderných genetických metód. Sumarizovali sme v ňom poznatky o genetickej podstate, ako aj možnostiach zdokonaľovania niektorých vlastností vínnych kvasiniek, predovšetkým tolerancie k etanolu, flokulačných schopností, produkcie killer toxínov, zníženej penotvorby, zlepšeného metabolizmu sírnych a iných zlúčenín atď. Keďže od uverejnenia tohto prehľadu sa objavili ďalšie práce z uvedenej problematiky týkajúce sa genetickej a biochemickej podstaty i spôsobu určovania flokulačných vlastností [2–5], tvorby smrtiacich toxínov u *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri* [6], *Hansenula anomala* [7], ale tiež antagonistického účinku (antibiózy) kvasiniek rodu *Kluyveromyces* a kontaminujúcich druhov *Kloeckera apiculata* [8], považovali sme za osožné na tomto mieste doplniť spomínaný literárny prehľad.

Dôležitými podmienkami pre cieľnú genetickú prípravu kmeňov kvasiniek s vylepšenými technologickými vlastnosťami je dostatok informácií o genetickej, biochemickej a fyziologickej podstate kvasničnej bunky, zvládnutie širokej palety techník génových manipulácií, ale predovšetkým o výber vhodného genofondu pozostávajúceho tak z existujúcich, aplikačne významných, ale aj ďalších šľachtiteľsky potrebných kmeňov. Pre náš program šľachtenia vínnych kvasiniek boli veľkou výhodou bohaté skúsenosti československej kvasinkovej školy, ako aj existencia svetovovýznamnej zbierky vínnych kultúr, ktorá poskytuje jedinečný východiskový materiál. Vzhľadom na cieľ nášho programu, ktorým je vývoj kmeňov so smrtiacimi vlastnosťami, flokulujúcimi schopnosťami, osmofilnosťou a optimalizovaným metabolizmom sírnych zlúčenín, sme vytýčili sériu 63 kultúr vínnych kvasiniek, pre ktoré boli v ďalšom zisťované základné znaky rozhodujúce tak z genetického ako aj aplikačného hľadiska (marker znaky). Zamerali sme sa na ploidiu, smrtiace vlastnosti, citlivosť na med a antibiotiká, nároky na rastové látky a schopnosť dýchania. Získané charakteristiky sme v ďalších experimentoch využili pri príprave a selekcii kmeňov s požadovanými vlastnosťami. Táto práca prináša výsledky prvej etapy programu.

MATERIÁL A METÓDY

V experimentoch sme použili 63 kmeňov vínnych kvasiniek rodu *Saccharomyces* zo zbierky Komplexného výskumného ústavu vinohradníckeho a vinárskeho v Bratislave, včítane priemyselne používaných (zoznam všetkých testovaných kultúr uvádza tabuľka 1). Ako štandardy pre testovanie smrtiacich vlastností boli využité, smrtiaci kmeň *Saccharomyces cerevisiae* T3DCII (zo zbierky ÚFHZ SAV Ivánka pri Dunaji) a citlivý kmeň *S. cerevisiae* S6/1 (poskytnutý dr. Vondrejsom, PFUK Praha). Pre stanovenie ploidie poslúžili ako štandard haploidný kmeň *S. cerevisiae* IL8-8D (poskytnutý dr. Šubíkom, VÚP Bratislava) a diploidný kmeň *S. cerevisiae* DTXII (zo zbierky ÚFHZ SAV Ivánka pri Dunaji).

Pri práci sme používali kultivačné pôdy tohto zloženia: kompletná pôda — glukóza 20 g, peptón 10 g, kvasničný autolyzát 10 g, agar 20 g v 1 l pôdy; minimálna pôda — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0,5 g, NaCl 0,1 g, CaCl_2 0,1 g, stopové soli, vitamíny, glukóza 20 g v 1 l pôdy, glycerolová pôda — peptón 10 g, kvasničný autolyzát 10 g, agar 20 g, glycerol 30 g v 1 l pôdy.

Testovanie smrtiacich vlastností sme robili na kompletnej agarovej pôde s citrát-fosfátovým tlmivým roztokom pH = 4,5, metylénovou modrou (0,01 %) a vrstvou štandardného citlivého alebo smrtiaceho kmeňa (10^5 buniek na Petriho misku) aplikovaného rozterom na povrch pôdy [9]. Testované kmene boli nanášané vo forme okružlej kolónie sterilným špáradlom. Smrtiace vlastnosti sme určovali na základe tvorby zóny potlačeného rastu citlivého kmeňa po 48 h kultivácii pri 22 °C.

Nukleové kyseliny boli z buniek nakultivovaných v kompletnej pôde extrahované metódou Frieda a Finka [10] a oddelené elektroforézou v 1 % agarózovom géli v tlmivom roztoku TRIS-acetát-EDTA, pH = 8. Jednotlivé frakcie boli vizualizované farbením s etídiumbromidom a fotografované po osvetlení germicídnu lampou cez červený filter. Veľkosť jednotlivých dsRNA bola určená na základe porovnania s veľkostným štandardom (λ DNA štiepená Hind III), a M, L dsRNA izolovanou z kmeňa T3DCII.

Nároky na rastové látky, schopnosť dýchania a citlivosť na antibiotiká boli charakterizované na pevných agarových pôdach. Na minimálnej pôde boli identifikované auxotrofné mutanty, nedýchajúce mutanty na glycerolovej pôde. Citlivosť na antibiotiká sme zisťovali na glycerolovej pôde s obsahom antibiotík-erytromycínu ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), mucidínu ($0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) alebo chloramfenikolu ($5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) po 3 až 4 dňoch rastu pri 28 °C [11].

Rezistencia k medi bola posudzovaná sledovaním rastu na minimálnej živnej pôde s obsahom 100, 300, resp. $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuSO_4 .

Ploidia buniek bola určená na základe obsahu DNA v bunke. Po extrakcii DNA z kvasiniek kyselinou chloristou bol jej obsah stanovený difenylaminovým činidlom a výsledok porovnaný s obsahom DNA v štandardných kmeňoch *S. cerevisiae* IL8-8D a DTXII [12].

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Ako už bolo spomenuté, cieľom našej práce bolo charakterizovať vybrané zbierkové kultúry vínnych kvasiniek, ktoré sú zaujímavé z technologického hľadiska a v ďalšom ich využiť pre prípravu kmeňov s vylepšenými aplikačnými vlastnosťami, a to cestou génových manipulácií. Metódami sexuálnej hybridizácie a indukovanej fúzie protoplastov sa vytvára hybridný klon spojením pôvodného s darcovským kmeňom požadovaných vlastností. Pri selekcii a izolácii hybridných klonov sa však vyskytujú ťažkosti s identifikáciou. Preto je potrebné poznať základné dedičné charakteristiky križovaných kvasiniek, ktoré možno použiť ako selekčné znaky. Tvar a farba kolónií, odolnosť a citlivosť k rôznym antibiotikám, schopnosť dýchania, závislosť buniek od jedného alebo viacerých rastových faktorov v prostredí, patria medzi najpoužívanejšie markery.

Pre naše testované kmene sme sledovali schopnosť dýchania, smrtiace vlastnosti, citlivosť na antibiotiká erytromycín, mucidín a chloramfenikol, citlivosť na med, ploidiu a charakterizovali požiadavky na rastové látky v kultivačnom prostredí. Zo získaných výsledkov vyplýva, že všetky posudzované kultúry rástli na minimálnej pôde bez prídavku rastových látok a sú teda prototrofné. Schopnosť dýchania všetkých sledovaných kvasiniek bola zistená ich spôsobilosťou rastu na glycerolovej pôde. Nedýchajúce kvasinky nie sú schopné rozmnožovania na neekvivalentnom substráte ako jedinom zdroji uhlíka napr.

na glycerole. Na pôde s erytromycínom rástlo 32 kmeňov, 48 bolo citlivých na chloramfenikol a všetkých 63 na mucidín. Zo študovaného genofondu bolo 34 kmeňov rezistentných k $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ medi, 5 kmeňov netolerovalo ani najnižší obsah ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$) CuSO_4 v pôde. Z testovaných kmeňov bol 1 haploidný, 54 diplo-

na kompletom agarovom médiu s metylénovou modrou a vytvárajú tak jasnú zónu s modrým okrajom (obr. 1). Neutrálne kmene netvorí zóny na vrstve citlivého kmeňa a na vrstve smrtiaceho kmeňa nemenia farbu — nemodrajú. Citlivé kmene nemenia farbu, ani nevytvárajú inhibičnú zónu. Pretože na základe zmeny farby ko-

Tabuľka 1. Základné charakteristiky študovaných kmeňov

Študovaný kmeň	Aplicačný znak	Ploidia	Rezistencia k medi	Rast na pôde					Smrtiaca aktivita
				MIN	GLY	CHMN	ERY	MUC	
S.o. 10-25-1	r	2n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. 10-25-2	r	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.o. 10-25-3	hp	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.o. 10-25-4	r	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.o. 10-25-5	r	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.o. 10-25-6	hp	2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.o. 10-25-7	hp	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.o. 10-25-8	hp	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.o. 10-25-9	r	2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.o. 10-25-10	r	2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.o. 10-25-11	r	2n	Cup + + +	+	+	+	-	-	K-R-
S.o. 10-25-12	r	2n	Cup +	+	+	+	-	-	K-R-
S.o. V 10-25-4	hp, r	2n	Cup -	+	+	+	+	-	K-R-
S.o. V 10-25-7	ps	3n	Cup +	+	+	-	-	-	K-R +
S.o. V 10-25-9	ps	2n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. V 10-25-10	hp, r	2n	Cup + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. V 10-25-11	s	2n	Cup + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. V 10-25-13	h	2n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. V 10-25-16	r	2n	Cup -	+	+	-	+	-	K-R +
S.o. V 10-25-17	r	3n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. V 10-25-18	hp, r	2n	Cup -	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. V 10-25-19	ch	4n	Cup + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. V 10-25-20	h	2n	Cup + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.c. Hliník 1	s	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R +
S.c. 13RVV/d	hp	2n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R +
S.c. 3MTV/XIII	hp	2n	Cup + +	+	+	+	+	-	K-R +
S.o. Fendant	ps	3n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.o. Myslenice	f	3n	Cup + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.o. 74/F	r, hp	2n	Cup + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. 76/D	r, hp	2n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. Bratislava	hp, r	2n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.c. V 10-13-1	č	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.c. V 10-13-2	č	2n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.c. V 10-13-3	č	n, α	Cup + +	+	+	-	+	-	K-R +
S.c. V 10-13-4	č	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R +
S.c. V 10-13-5	s, r	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.c. V 10-13-6	s, r	2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.c. V 10-13-7		2n	Cup + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.c. V 10-13-8		2n	Cup + + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.c. V 10-13-9		2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.c. V 10-13-10		2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.c. V 10-13-11		2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R +
S.c. V 10-13-12		2n	Cup + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.c. V 10-13-13		2n	Cup + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.c. V 10-13-14		2n	Cup + +	+	+	-	+	-	K-R-
S.c. 10-14-1		2n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.c. 10-15-1		2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.c. V 10-35-5	hp	2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.c. V 10-35-7	hp	2n	Cup -	+	+	+	+	-	K-R-
S.c. V 10-35-8	r, hp	2n	Cup -	+	+	+	+	-	K-R +
S.c. V 10-35-10	hp	2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.c. V 10-35-12	r	3n	Cup +	+	+	+	+	-	K-R-
S.c. V 10-35-13	r	2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.c. V 10-35-37	hp	2n	Cup + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.c. V 10-35-39	r, hp	2n	Cup + +	+	+	+	-	-	K-R-
S.o. 10-3-2	r	3n	Cup +	+	+	-	+	-	K-R-
S.c. 10-3-3	hp	4n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R +
S.c. 10-3-4	hp	2n	Cup + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.c. 10-3-6	hp	2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.o. 10-3-7	r	2n	Cup + + +	+	+	+	+	-	K-R-
S.o. 10-3-8	r	2n	Cup + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. 10-3-9	hp	2n	Cup + + +	+	+	-	-	-	K-R-
S.o. 10-3-10	hp	2n	Cup -	+	+	+	+	-	K-R-

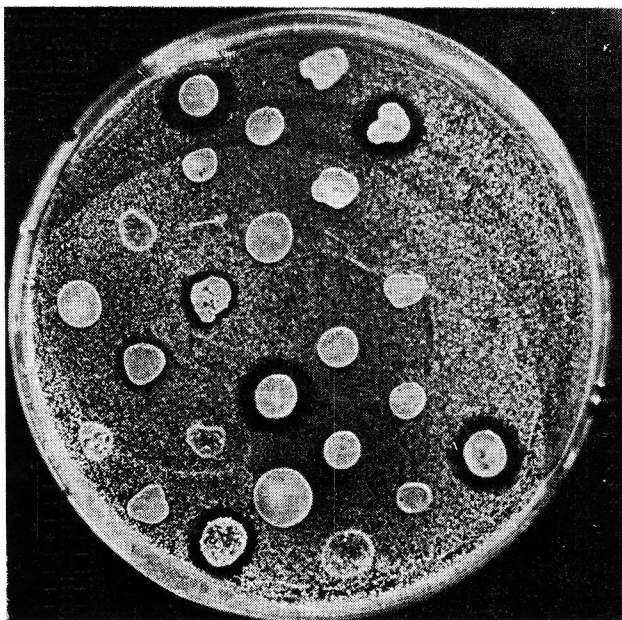
n — haploid, 2n — diploid, 3n — triploid? K-R — citlivý kmeň, K-R + — neutrálny kmeň, K-R + — smrtiaci kmeň? rastie +, nerastie — Cup — nerastie na pôde s CuSO_4 , Cup + + + — rastie na pôde s obsahom $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ CuSO_4 , Cup + — rastie na pôde s obsahom $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ CuSO_4 , Cup + + — rastie na pôde s obsahom maximálne $300 \mu\text{mol.l}^{-1}$ CuSO_4 .
r — rezistentný voči etanolu, hp — hlboko prekvášajúci, ps — psychrofilný, s — sulfitový, ch — vhodný pre šumivé vína, f — odolný voči fungicídom, č — vhodný pre červené vína, MIN — minimálny, GLY — s glycerolom, CHMN — s chloramfenikolom, ERY — s erytromycínom, MUC — s mucidínom.

idných a ostatné boli určené ako polyploidné. Získané výsledky sú sumárne zhrnuté v tabuľke 1.

Nakoľko jedným z hlavných cieľov nášho snaženia je pripravovať priemyselné kmene vínných kvasiniek so smrťiacimi vlastnosťami, zamerali sme sa na charakterizáciu smrťiacich schopností testovaných kmeňov. Smrťiaci charakter je významný z hľadiska zabránenia vzniku kontaminácie pri vedení fermentačného procesu. Určuje sa na základe tvorby zóny potlačeného rastu, resp. zmeny farby kolónií na vrstve citlivého, resp. smrťiaceho kmeňa. Kvasinky so smrťiacim charakterom vylučovaním smrťiaceho toxínu potláčajú rast buniek citlivého kmeňa

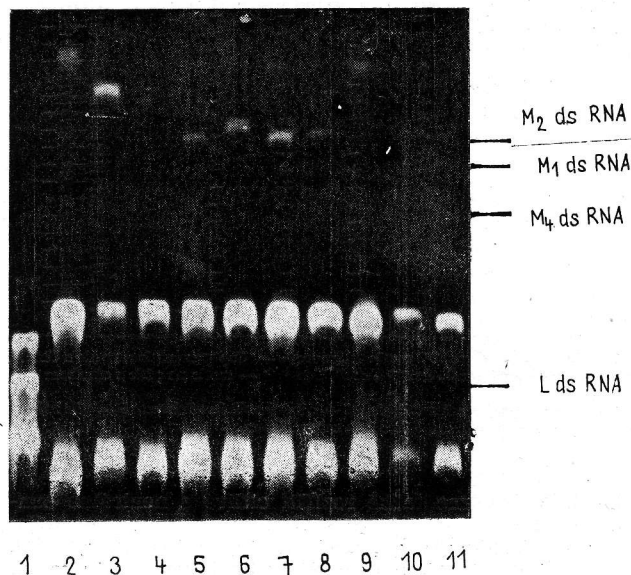
lónie je pomerne ťažké rozlíšiť citlivé a neutrálne bunky, presnejšie určenie je možné na vrstve testovaného kmeňa. Na túto vrstvu nanášame štandardný citlivý, resp. smrťiaci kmeň. Ak nanesený smrťiaci kmeň vytvára na vrstve testovaného kmeňa inhibičnú zónu, testovaný kmeň je citlivý. Smrťiaci ani citlivý kmeň neovplyvňuje rast a farbu neutrálneho kmeňa.

Zo študovaných kmeňov bolo uvedeným postupom 6 určených ako neutrálnych, 6 ako smrťiace a ostatné ako citlivé. Smrťiace kmene vytvárali inhibičné zóny, i keď rôznej veľkosti, aj na vrstve citlivého, aj na vrstve smrťiaceho kmeňa, čo svedčí o smrťiacich vlastnostiach iného



Obr. 1. Určovanie smrtiacich vlastností vínnych kvasiniek na vrstve citlivého kmeňa. Smrtiace kvasinky vytvárajú okolo kolónie zónu potlačeného rastu

typu ako u štandardného kmeňa. Presnejšie určenie fenotypu umožnila izolácia a separácia nukleových kyselín gélovou elektroforézou. Po extrakcii nukleových kyselín z buniek a oddelení elektroforézou boli tieto vizualizované v agarózovom géli farbením etídiumbromidom. Po odphotografovaní sa určovala prítomnosť M a L dvojvláknovej dsRNA v štandardných smrtiacich, citlivých a testovaných kmeňoch. Je známe, že smrtiace kvasinky rodu *Saccharomyces* obsahujú dve formy dsRNA — M a L. M zodpovedá za tvorbu smrtiaceho toxínu a imunitu hostiteľa k nemu. L ovplyvňuje udržiavanie M dsRNA v bunke [13, 14]. M dsRNA môže mať rôznu dĺžku v zá-



Obr. 2. Gélová elektroforéza nukleových kyselín extrahovaných z testovaných kmeňov vínnych kvasiniek pre účely detekcie dsRNA

1 — Dĺžkový štandard (λ DNA štiepaná Hind III), 2 — V 10-25-16, 3 — T3DCII, 4 — 3MTV/XIII, 5 — 10-25-5, 6 — V 10-13-4, 7 — 13 RVV/d, 8 — 10-25-8, 9 — V 10-25-20, 10 — V 10-13-4, 11 — 3MTV/XIII.

vislosti od typu smrtiaceho kmeňa. M₁ dsRNA s dĺžkou 1,9 kb určuje K1 typ smrtiacich kvasiniek, M₂ s dĺžkou 1,7 kb K2 typ a M₃ s dĺžkou 1,5 kb K3 typ smrtiacich kvasiniek. Pre vínnu kvasinku je typický smrtiaci charakter typu K2 [15].

Veľkosť dsRNA izolovanej zo študovaných kmeňov bola porovnaná s veľkosťou štandardov. Pohyblivosť jednotlivých M a L dsRNA v géli je nepriamo úmerná ich veľkosti. Najpohyblivejšia je M₃ s najmenšou veľkosťou, L dsRNA o dĺžke 4,7 kb je najmenej pohyblivá. Dĺžka testovaných dsRNA bola určená po odčítaní z kalibračnej závislosti pohyblivosti na veľkosti štandardov (obr. 2).

M₁ formu dsRNA neobsahoval ani jeden zo študovaných kmeňov. Smrtiaci charakter typu K2 s M₂ dsRNA bol zistený u kmeňov V 10-25-16 a V 10-25-20. M₃ dsRNA s dĺžkou 1,5 kb neobsahoval žiadny testovaný kmeň. Kmeň 13RVV/d obsahoval M₂ dsRNA, M s dĺžkou 2,0–2,1 kb a L dsRNA. Tri kmene (10-25-5, 10-25-8, V 10-13-4) obsahovali L dsRNA (4,7 kb) a M dsRNA s dĺžkou 2,0–2,1 kb. Vytvárali len malé inhibičné zóny a usmrcovali smrtiace kvasinky typu K1 a K2. Kvasinky môžu obsahovať obidve formy dsRNA — M aj L, iba L formu alebo žiadnu z nich. Medzi prírodnými izolátmi *S. cerevisiae* sa vyskytuje pomerne málo smrtiacich kmeňov, hoci väčšina izolátov má L formu dsRNA [13]. Naopak, v našej sérii bola zistená prítomnosť samotnej L dsRNA iba pre jeden kmeň (3MTV/XIII). Ostatné kmene, s výnimkou smrtiacich, neobsahovali žiadnu formu dsRNA.

Analýza dsRNA ukázala, že schopnosť produkovať smrtiace toxíny je skutočne viazaná na prítomnosť M formy dsRNA v bunke. Uvedené poznatky budú využité na výber a konštrukciu kultúrnych vínnych kvasiniek so smrtiacími vlastnosťami, odolných voči kontaminantom.

Literatúra

- [1] MICHALČÁKOVÁ, S. - ŠTURDÍK, E.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 293
- [2] STRATFORD, M. - KEEMAN, M. H. J.: Yeast, **3**, 1987, s. 201
- [3] STRATFORD, M. - KEEMAN, M. H. J.: Yeast, **4**, 1988, s. 107
- [4] KIHN, J. C. - MASY, C. H. - MESTDAGH, M. M.: Can. J. Microbiol., **34**, 1988, s. 773
- [5] KIHN, J. C. et al.: Can. J. Microbiol., **34**, 1988, s. 779
- [6] ZORG, J., KILIAN, S., RADLER, F.: Arch. Microbiol., **149**, 1988, s. 261
- [7] KAGIYAMA, S. et al.: Agric. Biol. Chem., **52**, 1988, s. 1
- [8] ROSINI, G. - CANTINI, M.: FEMS Microb. Lett., **44**, 1987, s. 81
- [9] WOODS, D. R. - BEVAN, E. A.: J. Gen. Microbiol., **51**, 1968, s. 115
- [10] FRIED, H. M. - FINK, G. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 1978, s. 4224
- [11] SHERMAN, F. - FINK, G. R. - HICKS, J. B.: Methods in Yeast Genetics, New York, Cold Spring Harbor Laboratory 1982
- [12] NORRIS, J. R. - RIBONS, D. W. (eds.): Methods in Microbiology **5B**, London, Academic Press 1971
- [13] TIPPER, D. J., BOSTIAN, K. A.: Microb. Rev., **48**, 1984, s. 125
- [14] BENDOÁ, O.: Folia Microbiol., **31**, 1986, s. 422
- [15] SHIMIZU, K. et al.: J. Ferment. Technol., **63**, 1985, s. 421

Lektoroval doc. Ing. Fedor Malík, CSc.

Michalčáková, S. - Sulo, P. - Šturdík, E. - Minárik, E.: Šľachtenie vínnych kvasiniek. II. Výber a základné charakteristiky genofondu. Kvas. prům., **35**, 1990, č. 1, s. 6–9.

Pre potreby prípravy kmeňov vínnych kvasiniek s požadovanými vlastnosťami genetickými metódami bola vybratá séria 63 kmeňov, pre ktorú boli charakterizované základné genetické, biochemické a fyziologické vlastnosti, konkrétne ploidia, sexuálny typ, nároky na rastové látky, citlivosť k antibiotikám a medi, schopnosť dýchania a smrtiace vlastnosti. Detailnejšie boli študované smrtiace vlastnosti testovaných vínnych kvasiniek.

Михальчакова, С. - Суло, П. - Штурдик, Е. - Минарик, Е.: Селекция винных дрожжей. II. Выбор и основные характеристики генотипа. Квас. prům., **36**, 1990, № 1, стр. 6–9.

V целях нужды в приготовлении штаммов винных дрожжей с требуемыми свойствами генетическими методами была избрана серия 63 штаммов, для которой были характеризованы основные генетические, биохимические и физиологические свойства, особенно плоидия, сексуальный тип, требование к веществам роста, чувствительность к антибиотикам и меди, способность дыхания и смертные свойства. Более подробно изучались смертные свойства исследующихся винных дрожжей.

Michalčáková, S. - Sulo, P. - Šturdík, E. - Minárik, E.: Improvement of Wine-Making Yeasts. II. Selection and Basic Genetic Characteristics. Kvas. prům., 36, 1990, No. 1, pp. 6—9.

Using genetical methods 63 strains were selected. For all these strains the following properties were characterized: the basic genetical, biochemical and physiological properties including ploidy, the sexual type, the growth factor requirements, the sensitivity to antibiotics and cooper, the respiration ability and the killing properties. The killing properties of the wine-making yeasts tested were studied more detailed.

Michalčáková, S. - Sulo, P. - Šturdík, E. - Minárik, E.: **Züchtung von Weinhefen. II. Selektion und Grundcharakteristik des Genofonds.** Kvas. prům., 36, 1990, Nr. 1, S. 6—9.

Für die Zwecke der Zubereitung von Weinhefestämmen mit geforderten Eigenschaften wurde bei Applikation genetischer Methoden eine Serie von 63 Stämmen ausgewählt. Für diese Stämme wurden die grundsätzlichen genetischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften charakterisiert, und zwar: Ploidität, Sexualtyp, Ansprüche an die Wachstumsstoffe, Empfindlichkeit auf Antibiotica und Kupfer, Atmungsfähigkeit und lethale Eigenschaften. Ausführlich wurden die lethalen Eigenschaften der testierten Weinhefen studiert.

Automatizovaný fermentační systém FS-70

663.1

Ing. ANTONÍN HAVLÍČEK, CSc., Ing. JAROSLAV BROŽEK, Ing. JOSEF KIEFMANN, Ing. JAN ČERMÁK, DrSc., Ing. VLADIMÍR HAVLÍN, CSc., Ústav teoretických základů chemické techniky ČSAV

Klíčová slova: fermentor, biotechnologie, řízení, automatizace

S přenosem biotechnologií z laboratorního do poloprodučního a provozního měřítka vystupuje do popředí ekonomická bilance každého procesu. Kultivovanému médiu již nelze věnovat takovou péči jako v laboratoři a efektivnost provozování biotechnologických procesů lze zajistit pouze řízením a regulací bioreaktoru. Automatizované fermentační jednotky — bioreaktory — vyrábí řada světových firem jako např. Rintekno, Foxboro, Brunswick (USA), Chemap, Bioengineering, MBR (Švýcarsko), Elektrolux (Švédsko) SGI (Francie), LH Fermentation (U. K.) aj. Fermentační systémy od těchto firem se vyznačují vysokou technickou úrovní, jsou vybaveny kvalitní měřicí a regulační technikou a často i řídicím počítačem, kompatibilním s řadou IBM PC. Ceny těchto zařízení jsou však značně vysoké a jejich devizová náročnost znesnadňuje širší rozšíření těchto velice potřebných zařízení v našem průmyslu a biotechnologickém výzkumu.

V ČSSR ani v zemích RVHP v současné době neexistuje výrobce ucelené, komplexně automatizované jednotky umožňující provozování technologicky náročnějších procesů a chybějí i základní prvky měřicí a regulační techniky, vyhovující specifickým nárokům biotechnologických procesů. Chybějí zejména snímače a regulátory průtoku plynů, snímače a regulátory tlaku, bioventily s dálkovým ovládáním, sterilovatelné, tlakové kryty elektrod, biologické, tepelně sterilovatelné filtry vzduchu pro střední průtoky (asi do 100 l.min⁻¹), speciální snímače výšky pěny, komunikační elektronika mezi snímači a počítačem, vícebitové A/D a D/A převodníky, vhodné skříně pro elektroniku a speciální softwarové vybavení pro řízení procesů v reálném čase.

V důsledku uvedeného nedostatečného přístrojového zázemí v oblasti biotechnologií v ČSSR bylo přistoupeno v ÚTŽCHT ČSAV ke komplexnímu řešení technologického vybavení číslíkově řízeného poloprodučního bioreaktoru. Výsledkem dvouletého vývoje je plně automatizovaný komplex zařízení 70 l bioreaktor s technologickým příslušenstvím, skříní elektroniky s analogovou regulací a nezávislý řídicí počítač. Celkové uspořádání automatizované jednotky je na obr. 1.

REAKTOR

Základem automatizované jednotky je tlakový reaktor o objemu 70 l s duplikátorovým pláštěm, vyrobený v Královopolských strojárnách Brno (nerezavějící ocel třídy 17 348). Reaktor je vybaven míchadlem poháněným elektromotorem přes magnetickou spojku. Toto bezúcpávkové řešení zlepšuje především aseptické podmínky uvnitř reaktoru a usnadňuje sterilaci vnitřního prostoru tanku.

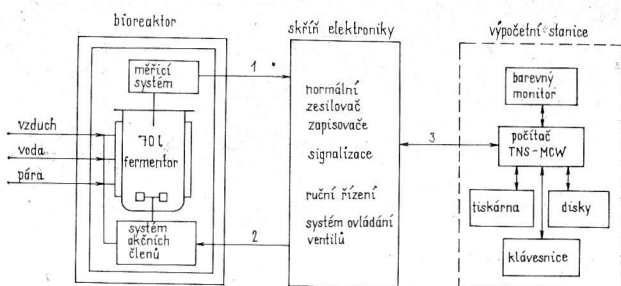
Reaktor je dále vybaven speciálními bočními pouzdry pro upevnění měřicích sond, umožňujícími aseptickou výměnu, čištění nebo rekaliibraci čidel i během procesu. Čidla jsou chráněna hermetickými kryty (rozměrově kompatibilními s elektrodami Ingold), které je možno propojit s vnitřním prostorem reaktoru, čímž je automaticky vyrovnán tlak na obou stranách membrány měřicí sondy.

Odklopné víko reaktoru je navrženo tak, že umožňuje univerzálně využívat jednotlivých otvorů podle potřeby, ať již pro upevnění dalších měřicích čidel (sondy pro měření výšky hladiny úrovně pěny, speciální sondy) pro přívody čidel (odpěňovací olej, kyseliny a zásady pro regulaci pH, živiny a substráty) nebo využití jako inokulační zátky apod.

Vyhřívání či chlazení tanku je zajištěno přes duplikátorový plášť temperačním okruhem, obsahujícím přívod chladicí vody, topné páry a průtočný elektrický ohříváč pro jemnou regulaci teploty. Potřebné hydrodynamické podmínky pro přestup tepla jsou zajišťovány oběhovým čerpadlem. Tlak v temperačním okruhu je jištěn ručně nastavitelným pojistným ventilem.

Cesta přívodu vzduchu obsahuje

- hrubý filtr vzduchu;
- blok kompaktních měřidel — regulátorů průtoku vzduchu a čistých plynů CO₂, O₂ a popř. dalších umožňujících provozování procesů ve speciální atmosféře. Zařízení je složeno ze snímače průtoku na termodynamickém principu, z analogového PI re-



Obr. 1. Architektura integrovaného fermentačního systému

1 — signály z čidel, 2 — signály z ovládání akčních členů, 3 — sériový kanál komunikace