

# Šľachtenie vínnych kvasiniek

663.252.41

## III. Používané techniky

Ing. SOŇA MICHALČÁKOVÁ, doc. Ing. ERNEST ŠTURDÍK, CSc.

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, 812 37 Bratislava

**Kľúčové slová:** vinné kvasinky, selekcia, mutagenéza, fúzia protoplastov, transformácia, rezistencia

Genetické zdokonaľovanie priemyselných kmeňov kvasiniek (včítane vínnych) vyžaduje zvládnutie a odskúšanie viacerých metód šľachtenia. Pri hľadaní a príprave nových kmeňov so žiadanými vlastnosťami sa najčastejšie využívajú štyri metodické prístupy. Je to selekcia klonov bez mutagenézy, selekcia po mutačnom šľachtení, hybridizácia a transformácia vrátane DNA rekombinantných techník. V nasledujúcom uvedieme základné charakteristiky týchto metód spolu so skúsenosťami získanými s nimi pri šľachtení vínnych kvasiniek v našom laboratóriu. Článok nadväzuje na dva predošlé [1, 2], venované literárnemu prehľadu o doterajšom stave šľachtenia vínnych kvasiniek vo svete a našim výsledkom dosiahnutým pri budovaní a charakterizácii základného genofondu pre následný, v súčasnosti už slubne rozpracovaný, šľachtiteľský program.

## 2. MATERIÁL

### 2.1 Použitý kmeň

V práci sme použili kmene vínnych kvasiniek zo zbierky Komplexného ústavu vinohradnícko-vinárskeho v Bratislave — *Saccharomyces oviformis* Bratislava 1, 74/F, 76/D, Fendant, Myslenice 1, V 10-25-25, *Saccharomyces cerevisiae* Hliník 1 a štandardný smrťaci kmeň *Saccharomyces cerevisiae* T3DCII.

### 2.2 Kultivačné pôdy

Kompletná glukózová pôda [zloženie v 1 dm<sup>3</sup>]: glukóza 20 g, pepton 10 g, kvasničný autolyzát 10 g. Tuhá pôda obsahovala navyše 20 g. dm<sup>-3</sup> agaru.

Minimálna živná pôda: glukóza 20 g, agar 30 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,7 g, NaCl 0,5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,4 g, FeCl<sub>3</sub> 0,005 g v 1 dm<sup>3</sup> vody, po autoklavovaní pridané 2 ml zásobného roztoku vitamínov, ktorý obsahuje v 2 dm<sup>3</sup> 20 µg biotínu, 2000 µg pantoténátu vápenatého, 2 µg kyseliny listovej, 10 000 µg inozitolu, 400 µg kyseliny nikotinovej, 200 µg kyseliny p-aminobenzoovej, 400 µg pyridoxalhydrochloridu, 200 µg riboflavínu a 400 µg tiaminhydrochloridu.

Glycerolová pôda [na identifikáciu respiračne deficitných mutantov]: glycerol 20 g, pepton 5 g, kvasničný extrakt 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 g, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,7 g, NaCl 0,5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,4 g, FeCl<sub>3</sub> 0,005 g v 1 dm<sup>3</sup> vody.

Sporulačná acetátová pôda: octan sodný 4 g, agar 20 g, v 1 dm<sup>3</sup> vody, pH 7,0.

Agarová pôda s obsahom 2, 3, 5 trifenylnitrazóliumchloridu (TTC): TTC 1 g, glukóza 1 g, agar 15 g v 1 dm<sup>3</sup> fosfátového tlmivého roztoku [0,1 mol. dm<sup>-3</sup>, pH 7].

Regeneračný agar: sorbitol 218,6 g, čistý agar 30 g, glukóza 20 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 g, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,7 g, NaCl 0,5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,4 g, FeCl<sub>3</sub> 0,005 g v 1 dm<sup>3</sup> vody, po sterilizácii pridané 2 ml zásobného roztoku vitamínov (obsah ako v minimálnej živnej pôde).

Minimálna diferenčná stabilizačná pôda: osmoticky stabilizovaná minimálna pôda, kde sa ako C zdroj použil glycerol [30 g. dm<sup>-3</sup>] a glukóza [2 g. dm<sup>-3</sup>].

Roztok ditiotreitolu: sorbitol 218,6 g, EDTA 9,3 g (pH 8,0), do ktorých sa po sterilizácii pridá 7,7 g ditiotreitolu na 1 dm<sup>3</sup> roztoku.

LB pôda: NaCl 5 g, baktotryptón 10 g, kvasničný extrakt 10 g, agar 15 g v 1 dm<sup>3</sup> vody.

Fixačný agar: glycerol 30 g, glukóza 1 g, CaCl<sub>2</sub> 58,8 g, agar 30 g v 1 dm<sup>3</sup> vody.

Osmoticky stabilizované pôdy obsahovali miesto vody roztok KCl [0,6 mol. dm<sup>-3</sup>].

## 3. METÓDY

### 3.1 Selekcia bez mutagenézy

Tento prístup stavia na genetickej rôznorodosti prirodzene sa vyskytujúcej v kmeňoch kvasiniek. Vyžaduje testovanie veľkého počtu klonov získaných z rodičovskej bunky vybraného kmeňa a neposkytuje výrazné zlepšenie väčšiny charakteristických vlastností. Robí sa na základe význačných, v praxi vyžadovaných vlastností ako sú rezistencia k alkoholu, SO<sub>2</sub>, odolnosť voči nízkej teplote, pesticídom a pod. Kmene sa izolujú zo spontánnej populácie vyrastenej na prirodzených substrátoch, udržiavajú v čistej kultúre, testujú za kontrolovaných podmienok a najlepšie z nich sú vybrané pre potreby praxe. Najčastejšie sa pri selekcii využíva metóda riedkeho výsevu. Napríklad pri selekcii kmeňa s rezistenciou k vysokej koncentrácii medi sa na sériu Petriho misiek s minimálnou pôdou obsahujúcou 0, 100, 300, resp. 500 µmol. dm<sup>-3</sup> CuSO<sub>4</sub> vyseje zriedená kultúra V 10-25-5 vyrastená v kompletnej pôde cez noc (asi 10<sup>2</sup> buniek na Petriho miskú). Po 3–5 dňoch sa na pôdach objavajú kolónie schopné tolerovať príslušné koncentrácie medi. Klony s rezistenciou k 500 µmol. dm<sup>-3</sup> CuSO<sub>4</sub> sa kultivujú v tekutom médiu a znovu vysejú na pôvodné pôdy. Dvojnásobnou selekciou sa získajú kolónie tolerujúce žiadajú koncentráciu medi.

Ďalším príkladom môže byť izolácia vínnych kvasiniek pre potreby sekundárnej fermentácie vína so zvýšenou toleranciou voči alkoholu z dokvášajúcich vín na princípe autoselekčného efektu [3]. Vzorky dokvášajúcich hroznových vín sa odoberajú z vrchnej časti veľkoobjemových nádrží a kvasinky izolované z jednotlivých vín sa očkujú na Sabouraudov agar s postupne sa zvyšujúcim obsahom etanolu — 12, 15 a 20 % obj. Po dvojdnovej kultivácii najintenzívnejšie rastúce kolónie na pôde s 15% etanolom sa preočkujú na Sabouraudov agar s 20 % obj. etanolu a na základe vizuálneho posúdenia intenzity rastu sa vyberú kmene pre ďalšie experimenty.

### 3.2 Mutačné šľachtenie

Mutačné šľachtenie patrí medzi najčastejšie používané metódy šľachtenia mikroorganizmov, pričom sa snažíme vybrať zmenené formy, ktoré vznikli zásahom mutagénov do molekúl DNA. Po mutácii sa mení povaha len niektorých vlastností, napr. flokulačná schopnosť, tvorba esterov atď. Veľký počet vlastností môže ostať nezmenený. Indukovaná mutagenéza, či už chemická alebo fyzikálna, sa využíva na získavanie auxotrofných alebo respiračne deficitných kmeňov, mutantov s rôznou citlivosťou voči antibiotikám a pod., ktoré môžu byť vhodnými partnerskými kmeňmi pri príprave hybridných kmeňov fúziou protoplastov alebo recipientnými kmeňmi pre DNA v transformačných experimentoch [13].

#### 3.2.1 Chemická mutagenéza

Pri príprave respiračne deficitných (rho<sup>-</sup>) mutantov technologických kmeňov vínnych kvasiniek možno použiť kultiváciu v kompletnej pôde s prídavkom 25 µmol. dm<sup>-3</sup> etídiumbromidu ako mutagéna (Sigma, USA). Kultivačná pôda sa naočkuje kvasinkami na počiatočnú koncentráciu 5 · 10<sup>5</sup> buniek v 1 ml. Po 24 h rastu pri 28 °C sa

Tabuľka 1. Frekvencia [f] vzniku rho<sup>-</sup> mutácií vínnych kvasiniek *Saccharomyces species*

Použitý kmeň	f (%)
76/D	98,8
74/F	95,0
Myslenice 1	95,0
Bratislava 1	99,2
Hliník 1	99,6

bunky vysejú na Petriho misky s kompletnou a glycerolovou pôdou. V dôsledku mutácie v mitochondriálnej DNA respiračne deficitné kmene nie sú schopné rásť na neskvasiteľných substrátoch, napr. na glycerole, laktáte a na kompletnej pôde vytvárajú malé (mikroskopické) kolónie. Frekvencia vzniku rho<sup>-</sup> mutácií vyjadrená ako pomer nedýchajúcich a pôvodne vysiatych buniek sa pohybuje v rozmedzí 95 až 99 % (tabuľka 1). Na zabránenie vzniku klonálnej selekcie sa zmieša po 5 kolónií z každého kmeňa a použije v ďalších experimentoch.

### 3.2.2 Mutagenéza UV svetlom

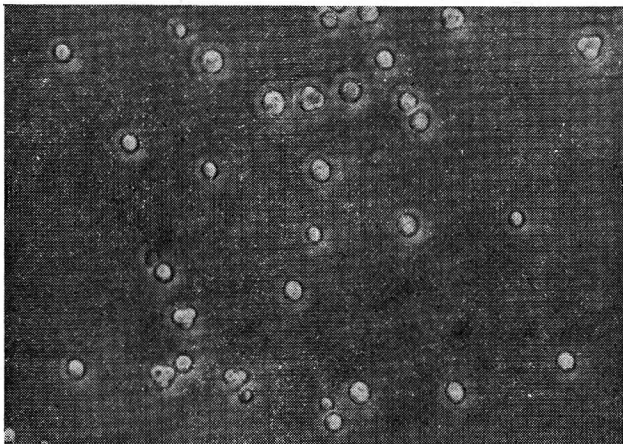
Bunky 20 h rastúcej kultúry kvasiniek *Saccharomyces oviformis* 74/F sa nariaďia na koncentráciu 10<sup>6</sup> buniek v ml. Približne po 10<sup>5</sup> buniek sa nanesie na sériu Petriho misiek s kompletnou pôdou a otvorené misky sa po dvojiciach exponujú UV svetlom zo vzdialenosti 20 až 30 cm od 30 W germicídnej výbojky (UV lampa VS 310) po dobu 0, 15, 30, 45, 60 a 90 sekúnd. Kontrolná miska zostane neožiarená. Po kultivácii (2 až 6 dní) pri teplote 28 °C v tme (aby sa zabránilo postradiačnej reparácii) podľa nárastu buniek na platni sa vyhodnotí prežitie a jednotlivé kolónie sa pretestujú na selekčných glycerolových pôdach. Určí sa frekvencia výskytu respiračne deficitných mutantov. Respiračne deficitné kolónie možno rozlíšiť i priamo po zaliatí kolónií agarom s trifenyltetrazóliumchloridom. Kolónie normálnych buniek pod týmto agarom po 1 až 2 h zružovejú, kolónie RD mutantov zostanú biele. Optimálnou dávkou UV žiarenia sa ukázalo byť ožiarenie v dĺžke 30 s zo vzdialenosti 25 cm od 30 W germicídnej lampy. Z 10<sup>5</sup> buniek po pôsobení UV svetla vyrástlo na príslušnej Petriho miske 47 kolónií, z ktorých 38 bolo respiračne deficitných. Z celej série Petriho misiek sme izolovali 48 nedýchajúcich kolónií.

### 3.3 Kríženie

Kmene kvasiniek so zlepšenými vlastnosťami možno ďalej získať hybridizáciou. Táto sa uskutočňuje krížením spór, krížením buniek opačných párovacích typov, alebo fúziou protoplastov [4].

#### 3.3.1 Kríženie spór pomocou mikromanipulátora

Používa sa predovšetkým u homotalických kmeňov kvasiniek [5]. 24-hodinové rodičovské kultúry vyrastené v tekutej kompletnej pôde sa po premytí sterilnou destilovanou vodou nanesú na sporulačnú acetátovú pôdu. Sporulujúca kultúra (obr 1) sa naleptáva 40 minút až 1 hodinu vo vodnom roztoku lytických enzýmov z hepatopankreasu slimáka záhradného *Helix pomatia* (30–60 mg/ml H<sub>2</sub>O). Leptanie sledujeme mikroskopicky v časových (10 minútových) intervaloch a prerušenie sa uskutoční zriedením sterilnou vodou. Naleptané asky sporulujúcich rodičovských kmeňov sa očkovacou ihlou na-



Obr. 1. Sporulujúca kultúra vinných kvasiniek *Saccharomyces oviformis* Bratislava 1. (Foto Dr. V. Vollek)

nesú na agarovú vrstvu izolačného krycieho skla tak, aby nesplynuli. K vyzolovaným spóram z asku jedného rodiča na mikromanipulačnom agare sa čo najbližšie priložia spóry druhého rodiča pomocou mikromanipulačnej ihly. Po vytvorení zygót za 5 až 12 hodín sa mikromanipulačný agar preniesie na kompletný agar, inkubuje 24 hodín pri teplote 28 °C, až kým nevyrastú diploidné kolónie.

Týmto spôsobom boli získané vinné kvasinky s vyššou psychrotoleranciou ako mali rodičovské kmene a odolnosťou voči fungicídu Euparén [6]. Trojnásobnou selekciou v chlade a následnou UV mutagenézou bol z kmeňa Fendant získaný UV rezistentný psychrotolerantný izolát. Spóry kmeňa sa krížili so spórmi kmeňa 74/F. Z 8 krížení vzniklo 7 pravých hybridov, ktoré tvorili nerodičovské kombinácie mitochondriálnych znakov a vyznačovali sa vyššie uvedenými vlastnosťami.

Popísaná technika vyžaduje rodičovské kmene s vysokou sporulačnou efektívnosťou a veľkou viabilitou spór. Preto určitým obmedzením pre použitie tejto metódy pre vinné kvasinky je fakt, že väčšina priemyselných kmeňov nesporuluje alebo vytvára spóry len s nízkou životaschopnosťou.

#### 3.3.2 Kríženie buniek opačných párovacích typov

Klasická hybridizácia patrí k základným postupom v genetike kvasiniek. Jej podstatou je zmiešanie mladých buniek opačných párovacích typov v kompletnej pôde s následnou izoláciou vzniknutých zygót po 17 až 24 h alebo ich diploidného potomstva [5]. Získané zygóty oddelíme od rodičovských buniek pomocou mikromanipulátora. Ak nie je k dispozícii, použijeme selekciu hybridov na základe dopĺňajúcich sa jadrových alebo mitochondriálnych znakov. Najjednoduchšie sa hybridizácia uskutočňuje pri heterotalických kmeňoch, ktoré možno udržiavať v haploidnom stave dlhší čas. Pri homotalických kmeňoch po sporulácii sa bunky spájajú veľmi rýchlo, v populácii prakticky nie je haploidné potomstvo. Pre takéto kmene sa využíva šľachtenie krížením spór. Väčšinu vinných kvasiniek, hlavne priemyselných, však tvoria kultúry homotalické, aneuploidné alebo polyploidné, s nízkou sporulačnou schopnosťou. Preto sme túto metódu v našom šľachtiteľskom programe nepoužívali.

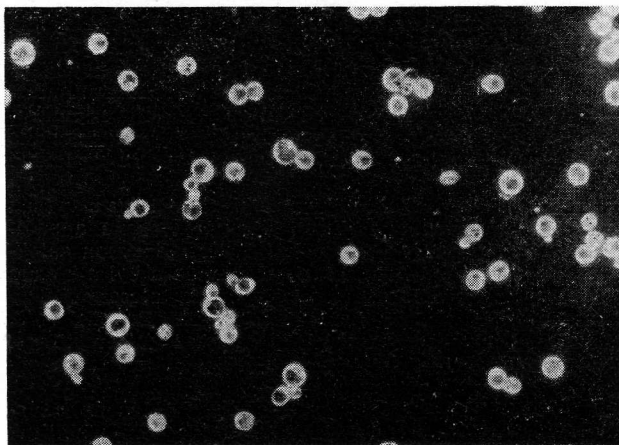
#### 3.3.3 Fúzia protoplastov

Fúzia protoplastov patrí k často používaným metódam pri genetickej manipulácii priemyselných kmeňov. Umožňuje konštruovať hybridné bunky, ak ich nemožno získať normálnou sexuálnou hybridizáciou. Nezávisí na ploidii buniek, párovacom type a má význam i pre aplikáciu u aneuploidných a polyploidných kmeňov. V prvej fáze vyžaduje prípravu protoplastov z rodičovských buniek.

Kvasinky kultivované 12 h pri 30 °C v kompletnom médiu (koncentrácia 10<sup>7</sup> až 10<sup>8</sup> buniek v 1 ml) sa po centrifugácii (10 min pri 1500 g) a dvojnásobnom premytí vodou resuspendujú v roztoku 0,1 mol.dm<sup>-3</sup> TRIS.HCl pH 9,3 s 28 mmol.dm<sup>-3</sup> 2-merkaptotanolom (2,5.10<sup>9</sup> buniek na ml). Po 20 min pri 30 °C sa bunky odcentrifugujú (10 min, 1500 g), premyjú 0,6 mol.dm<sup>-3</sup> KCl, resuspendujú v roztoku zmesi lytických enzýmov z tráviaceho traktu slimáka záhradného *Helix pomatia* v 0,6 mol.dm<sup>-3</sup> KCl (5.10<sup>9</sup> buniek v ml, 50 mg/ml) a inkubujú 30 až 60 min pri 30 °C. Vznik protoplastov sa kontroluje zmenou zákalu suspenzie vo vode (osmotická lýza) a mikroskopicky. Získané protoplasty po premytí 0,6 mol.dm<sup>-3</sup> KCl sa uchovávali v tomto roztoku pri teplote 4 °C [7, 8].

V našej práci bola technika fúzie protoplastov použitá na prípravu kmeňov vinných kvasiniek so smrtiacimi vlastnosťami [9]. Donorom smrtiaceho charakteru bol laboratórny kmeň K1 typu *Saccharomyces cerevisiae* T3DCII s viacerými auxotrofnými mutáciami, ktorý vyžaduje pre rast na syntetickej pôde adenín, leucín a uracil. Recipientom bol respiračne deficitný mutant hlbokoprekvážajúceho kmeňa vinných kvasiniek Myslenice 1, odolného voči ftalimidovým fungicídmi. Z oboch rodičovských kmeňov boli uvedeným postupom pripravené protoplasty. Celkový výťažok protoplastov bol väčší ako 95 % [obr. 2]. Na fúziu sa použilo 10<sup>8</sup> protoplastov [v 0,6





Obr. 2. Protoplasty kvasiniek *Saccharomyces oviformis* 76/D pripravené lýzou bunkovej steny pomocou lytických enzýmov z hepatopankreasu slímaka záhradného osmoticky stabilizované v roztoku KCl ( $0,6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) (foto Dr. V. Vollek)

$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KCl) z každého rodičovského kmeňa. Po zmiešaní sa suspenzia centrifugovala (10 min, 1500 g), supernatant bol zliaty a sediment resuspendovaný v 2 ml 40% polyetylén glykolu (molekulová hmotnosť 4000) s  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{CaCl}_2$  a  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  TRIS.HCl pH 7,5. Po 30 min inkubácii pri  $30^\circ\text{C}$  boli protoplasty odstredené (10 min, 1500 g), resuspendované v 2 ml  $0,6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KCl a objemy zodpovedajúce  $2 \cdot 10^6$  až  $2 \cdot 10^7$  protoplastov vysiate na selektívne pôdy a zaliate fixačným agarom. Po 7-dňovej kultivácii pri  $30^\circ\text{C}$  pomer počtu vyrastených kolónií a vysiatych protoplastov vyjadroval mieru regenerácie, ktorá dosahovala hodnoty 12 až 38 %. Selektia hybridných klonov vyžaduje odlišnosť rodičovských kmeňov v určitých vlastnostiach, ktoré sa po fúzii protoplastov navzájom dopĺňajú. Najčastejšie sa využíva odlišná citlivosť k antibiotikám, nároky na rastové látky v prostredí alebo schopnosť dýchania. V našom prípade boli fúziou získané hybridy selektovateľné na minimálnej diferencnej pôde osmoticky stabilizovanej  $0,6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  KCl obsahujúcej ako C zdroj glycerol. Ak na selekčnú pôdu boli vysiate osobitne protoplasty vinných kvasiniek a smrtiaceho donora, nebol pozorovaný nárast kolónií. V prvom prípade pre neschopnosť utilizovať glycerol, v druhom pre neschopnosť rásť na pôdach bez adenínu, uracilu a leucínu. Hybridy vinných kvasiniek so smrtiacim charakterom a mitochondriami respirujúceho kmeňa T3DCII získali schopnosť rásť na glycerole a po 7 až 10 dňoch kultivácie vytvorili výrazné kolónie o veľkosti 1 až 2 mm vo frekvencii  $10^{-5}$ . Popísanou technikou bolo v našom laboratóriu pripravených päť priemyselných kmeňov vinných kvasiniek so smrtiacimi vlastnosťami K1 typu.

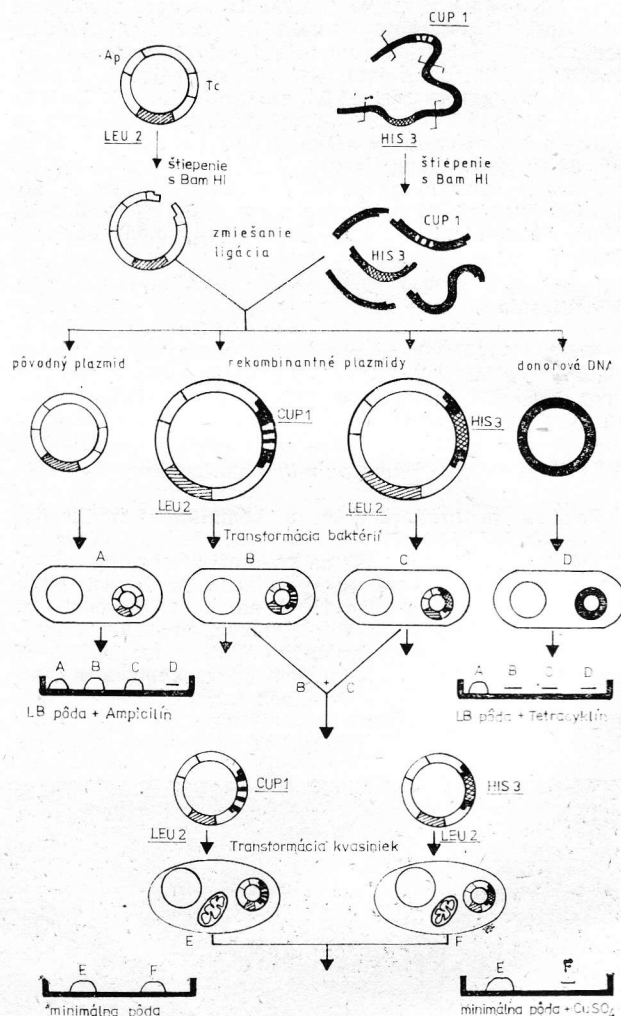
### 3.4 Transformácia vinných kvasiniek

Asexuálnou technikou pre získanie genetických rekombinantov je transformácia, ktorá vyžaduje prenos a expresiu DNA z donorového kmeňa v želanej recipientnej bunke. Umožňuje prekonať nešpecifitu fúzie protoplastov a je použiteľná pre polyploidné a aneuploidné priemyselné kmene kvasiniek. Pre úspešný priebeh transformácie je potrebné odstrániť bariéru tvorenú bunkovou stenou a cytoplazmatickou membránou. Po odstránení bunkovej steny v prítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iónov a polyetylén glykolu vstupuje donorová DNA do protoplastu a zabuduje sa do genómu recipienta. Celé bunky sa používajú pri transformačných pokusoch menej, pretože účinnosť transformácie je nižšia ako pri použití protoplastov. K adsorpcii DNA a jej prieniku do bunky dochádza v prostredí  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Na}^+$  iónov.

Pokrokom v metodológii rekombinantnej DNA v kvasinkách bolo použitie plazmidových vektorov, ktoré sú schopné replikácie v kvasinkových i bakteriálnych bunkách. DNA, ktorá má byť prenesená do hostiteľskej bunky sa štiepi enzýmom restriktčnou endonukleázou, získajú

né fragmenty DNA sa pripoja na plazmidový vektor, tento sa vnesie do bunky recipienta a zabuduje do jej genómu [10]. Ako prenášače genetickej informácie sa v transformačných experimentoch u kvasiniek používajú replikatívne (YRp), epizomálne (YE<sub>p</sub>), centromérne (YC<sub>p</sub>) a integratívne (Yip) plazmidy a kozmidy (pYC) [11, 12]. Celú stratégiu ilustruje obr. 3. Pre šľachtenie vinných kvasiniek majú transformačné techniky dve výhody. V prvom rade umožňujú preniesť ľubovoľný jednotlivý gén do kvasinky a adekvátnu expresiu tohto génu v hostiteľskej bunke. Okrem toho umožňujú vyhnúť sa porušeniu celkového genotypu vinných kvasiniek, ktoré sa môže vyskytnúť pri selekcii rekombinantov po hybridizácii.

Hostiteľský kmeň *Saccharomyces cerevisiae* sa zaočkuje do 50 ml kompletnej pôdy a inkubuje 16 h pri  $30^\circ\text{C}$  na trepačke. Získanou kultúrou sa inokuluje 200 ml kompletnej pôdy a nechá dorásť pri  $30^\circ\text{C}$  na koncentraciu  $2$  až  $3 \cdot 10^7$  buniek v ml. Bunky sa centrifugujú (5 min pri 800 g), premyjú sterilnou vodou a resuspendujú v 60 ml roztoku diitotritolu. Po 10 min inkubácii pri  $30^\circ\text{C}$  a následnej centrifugácii (5 min, 800 g) sa bunky resuspendujú v 30 ml roztoku  $1,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  sorbitolu a pipetujú po 3 ml do sterilných centrifugačných



Obr. 3. Transformácia kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* auxotrofných na leucín a citlivých voči iónom medi. Postup zahŕňa prípravu rekombinantných plazmidov obsahujúcich fragmenty DNA kvasiniek rezistentných voči medi, pomnoženie v baktériách s následnou izoláciou, transformáciu vhodných kmeňov i selekciu a identifikáciu transformantov. LEU2, HIS3 a CUP1 sú gény kvasiniek špecifikujúce syntézu leucínu, histidínu a rezistenciu k medi. Ap, Tc sú gény baktérií kódujúce rezistenciu k ampicilínu a tetracyklínu

skúmaní, z ktorých každá môže byť použiteľná na 1 až 4 transformačné reakcie. Z buniek hostiteľského kmeňa sa pripravujú protoplasty vyššie uvedeným postupom a resuspendujú v 0,2 ml roztoku 1,2 mol. dm<sup>-3</sup> sorbitolu v 0,01 mol. dm<sup>-3</sup> CaCl<sub>2</sub>. K suspenzii sa pridá 0,1 až 1 µg plazmidovej DNA nesúcej zabudovaný gén, zmes sa inkubuje 15 min pri laboratórnej teplote. Potom sa pridá 1,8 ml roztoku PEG 4000 (PEG 400 g, CaCl<sub>2</sub> 1,47 g, TRIS. HCl 1,2 g, pH 8,0 v 1 dm<sup>3</sup> vody), suspenzia sa premieša a nechá stáť 5 min pri laboratórnej teplote. Protoplasty sú potom oddelené centrifugáciou [5 min pri 1000 g), sediment sa resuspenduje v 0,2 ml roztoku sorbitolu v CaCl<sub>2</sub> a k suspenzii sa pridá 0,1 ml sorbitolu v kvasničnom extrakte (sorbitol 218,6 g, glukóza 20 g, kvasničný extrakt 10 g v 1 dm<sup>3</sup> vody). Po 30 min inkubácii pri 30 °C sa k suspenzii pridá 0,3 ml roztoku sorbitolu, 0,15 ml vzniknutej suspenzie sa napipetuje do skúmaviek s 10 ml rozvarného regeneračného agaru o teplote 44 °C a po premiešaní vyje na povrch selektívneho osmoticky stabilizovaného minimálneho agaru, na ktorom regenerujú a rastú len transformanty obsahujúce plazmidovú DNA. Po 3 až 5 dňoch sa vyhodnotí frekvencia transformácie a vzniknuté kolónie sa podrobia genetickej a biochemickej analýze. Popísaná technika je v našom laboratóriu využívaná pre zavedenie génov kódujúcich rezistenciu voči mednatým iónom do vhodných aplikačne významných kmeňov vínnych kvasiniek. O získaných poznatkoch budeme referovať v niektorom z budúcich čísel nášho časopisu.

#### Literatúra

- [1] MICHALČÁKOVÁ, S., ŠTURDÍK, E.: Kvas. prům., 34, 1988, s. 293.
- [2] MICHALČÁKOVÁ, S., et al.: Kvas. prům., 36, 1990, s. 6.
- [3] MALÍK, F., VOLLEK, V., HRONČEK, J., MORVAYOVÁ, E.: Kvas. prům., 35, 1989 s. 141.
- [4] SPENCER, J. T. F., SPENCER, D. M.: Ann. Rev. Microbiol., 37, 1983, s. 121.
- [5] KOVÁČOVÁ, V.: Genetická analýza mikroorganizmov I. Tetrádová analýza kvasiniek. Bratislava, Skripta PFUK 1983.
- [6] KOVÁČOVÁ, V.: 1989, nepublikované výsledky.
- [7] KOVÁČ, L., BEDNÁROVÁ, H., GREKSÁK, M.: Biochim. Biophys. Acta, 133, 1988, s. 32.
- [8] SULO, P.: Štúdium prenosu mitochondriálneho genómu, fúzie a transformácie pomocou cytoplazmatických mutantov *S. cerevisiae*. [Kandidátska dizertačná práca]. ÚFHZ SAV Ivánka pri Dunaji 1987.
- [9] SULO, P., MICHALČÁKOVÁ, S.: Construction of wine yeasts with killer properties. In: Zborník Interbiotech 88, Bratislava 1988, s. 106.
- [10] ESSER, K., KÄMPER, J.: Process Biochem., 23, 1988, s. 36.
- [11] MICHALČÁKOVÁ, S., ŠTURDÍK, E., ŠUBÍK, J.: Laboratórium odboru I. Genetika mikroorganizmov a základy génových manipulácií. Bratislava, Skripta SVŠT 1989.
- [12] SAUNDERS, V. A., SAUNDERS, J. R.: Microbial Genetics Applied to Biotechnology. 1. vyd. London, Croom Helm 1987.
- [13] VRANÁ, D. (ed.): Kvasinky ve výzkumu a praxi, 1. vyd. Academia, Praha 1986.

Lektoroval doc. Ing. F. Malík, CSc.

Michalčáková, S. - Šturdík, E.: Šľachtenie vínnych kvasiniek. III. Používané techniky. Kvas. prům., 36, 1990, č. 7, s. 196—199.

Článok je prehľadom metód používaných pri šľachtení kvasiniek [selekcia, indukovaná mutagenéza, kríženie, fúzia protoplastov, technika rekombinantnej DNA] a možností ich aplikácie pri získavaní nových kmeňov vhodných pre vinárske použitie. Detailne sú charakterizované predovšetkým selekčné techniky umožňujúce získať kmene rezistentné k medi a etanolu, ale tiež postupy mutačného šľachtenia a fúzie protoplastov vedúce k príprave respiračne deficitných mutantov a smrtiláčich vínnych kvasiniek.

Michalčáková, S. - Šturdík, E.: Селекция винных дрожжей. III. Применяемые способы. Квас. прум. 36, 1990, № 7, стр. 196—199.

Статья приводит обзор по методам, применяемым при селекции дрожжей (селекция, индуцированный мутагенез, скрещивание, фузия протопластов, способ рекомбинантной ДНА) и по возможностям их применения при получении новых штаммов, подходящих для целей виноделия. Подробно характеризуются прежде всего способы селекции, позволяющие получить штаммы, устойчивые в отношении к меди и этанолу, а также способы мутационной селекции и фузии протопластов, приводящие к получению респираторнодефицитных мутантов и смертоносных винных дрожжей.

Michalčáková, S. - Šturdík, E.: Improvement of Wine-Making Yeasts. III. Techniques Used. Kvas. prům., 36, 1990, No. 7, pp. 196—199.

The methods for yeast improvements (selection, induced mutagenesis, hybridization, protoplast fusion, technique of recombinant DNA) and their applications for an obtaining of new strains suitable in a wine-making are outlined in the article. The selection techniques permitting to obtain strains resistant to copper and ethanol and the mutation procedures and the protoplast fusions resulting in a preparation of respiratory deficient mutants and the killers of wine-making yeasts are discussed in details.

Michalčáková, S. - Šturdík, E.: Züchtung der Weinhefen. III. Angewandte Techniken. Kvas. prům., 36, 1990, Nr. 7, S. 196—199.

Der Artikel bringt eine Übersicht der bei der Züchtung der Hefen angewandten Methoden [Selektion, induzierte Mutagenese, Kreuzung, Fusion der Protoplaste, Technik der DNA-Rekombination] und befaßt sich mit den Möglichkeiten ihrer Applikation bei der Gewinnung neuer Stämme für die Weinindustrie. Detailliert werden vor allem die Selektionstechniken charakterisiert, die zu Kupfer- und Äthanol-resistenten Stämmen führen; es werden aber auch die Verfahren der Mutationszüchtung und der Protoplasten-Fusion behandelt, die zur Gewinnung Respirations-defizienter Mutanten und Killer-Weinhefen führen.

## Morfologické změny kvasinek *Torulopsis ethanolitolerans* při kontinuální kultivaci

579.663.12

Ing. JOHANNA RYBÁŘOVÁ, CSc., Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, Praha, Ing. JITKA ŘEŽÁBKOVÁ, Pražské pivovary, s. p., Praha

**Klíčová slova:** morfologické změny, kontinuální kultivace, limit kyslíku, poměr délky a šířky, *Torulopsis ethanolitolerans*.

#### ÚVOD

Morfologické změny při růstu mikroorganizmů v podmínkách kontinuální kultivace byly popsány již v prvních studiích této kultivační metody, a to jak u bakteriálních, tak u kvasinkových kultur. Prodlužování buněk *Saccharomyces cerevisiae* rostoucích na melase pozoroval Beran [1], který stanovil, že poměr délky k šířce

1,46 oválných buněk na začátku kultivace se poměrně rychle zvýšil na hodnotu 2,1. Podobné změny zjistil při všech zkoušených růstových rychlostech a při různém složení melasového média. Herbert [2] stanovil v kultuře *Enterobacter aerogenes*, že se vzrůstající růstovou rychlostí (od 0,1 do 0,9 h<sup>-1</sup>) se buňky zvětšovaly, hlavně v délce, rostla průměrná hmota buněk a současně se značně zvyšoval obsah RNK. Příčinou prodlužování kva-