

Šľachtenie vínnych kvasiniek

663.421

IV. Selekcia a vlastnosti smrtiacich kmeňov

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

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

Kľúčové slová: *vínne kvasinky, selekcia smrtiacich kmeňov, smrtiace vlastnosti, pH profil zymocínov, izolácia smrtiacich toxínov*

1. ÚVOD

Pre kvasinky so smrtiacimi účinkami (killer yeasts) je typická produkcia extracelulárnych proteínových toxínov [zymocínov], ktoré letálne pôsobia na bunky k nim citlivých kmeňov. Charakteristické vlastnosti smrtiacich kmeňov rôznych rodov, charakter smrtiacich toxínov i mechanizmus ich účinku popísali súborne viacerí autori [1–5] a boli publikované i v tomto časopise [6–8]. V niektorých krajinách prípravou priemyselných kmeňov kvasiniek so smrtiacimi vlastnosťami úspešne vyriešili niektoré problémy vzniku kontaminácií pri výrobe piva, vína a nápojov typu saké [9–11]. Pri konštrukcii smrtiacich kmeňov boli použité techniky sexuálnej hybridizácie [9], „vzácného párenia“ [10], fúzie protoplastov [12]. Hlavnou výhodou pripravených kmeňov je ich väčšia priebornosť v mikrobiálnej populácii kvasiacich médií, a to i v praktických podmienkach fermentácií vo veľkokapacitných nádržiach. Nedochádza tak k poruchám kvasenia akými sú napríklad oneskorený začiatok fermentácie, jej pomalý priebeh, nedostatočné prekvasenie a podobne. Získanie vhodných „killer“ kvasiniek pre použitie vo vinárskej praxi sa stalo jednou z dôležitých úloh aj nášho šľachtiteľského programu. Pre jej vyriešenie sme na vybratom genofonde zbierkových i prevádzkových kultúr [13] realizovali príslušné šľachtenie, a to všetkými používanými metódami, t. j. selekciou, mutagenezou, hybridizačnými a DNA-rekombinantnými technikami [14]. Tento článok popisuje výsledky získané použitím prvej zo spomínaných metód. Naším cieľom bolo jednoduchou selekciou nájsť medzi zbierkovými kultúrami vínnych kvasiniek smrtiace kmene, určiť genetické determinanty kódujúce produkciu ich smrtiacich toxínov a posúdiť vhodnosť využitia vybratých kmeňov pre prípravu priemyselných smrtiacich kvasiniek ďalšími metódami šľachtenia.

2. MATERIÁL A METÓDY

V práci sme študovali 5 kmeňov vínnych kvasiniek zo zbierky Komplexného výskumného ústavu vinohradníckeho a vinárskeho v Bratislave (RI-VE 28) *Saccharomyces oviformis* 10-25-5, 10-25-8, V 10-25-16, V 10-25-20, *Saccharomyces cerevisiae* V 10-13-4 a štandardné kmene: smrtiaci *Saccharomyces cerevisiae* PSY-1 ($K_1^+R_1^+$) a citlivý *Saccharomyces cerevisiae* S6/1 (K^-R^-).

Používali sme tri typy kultivačných pôd. Komplexná pôda obsahovala glukózu 20 g, peptón 10 g, kvasničný autolyzát 10 g, agar 20 g v 1 dm³; minimálna pôda (NH₄)₂SO₄ 5 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄

0,5 g, NaCl 0,1 g, CaCl₂ 0,1 g, glukózu 20 g, stopové soli a 1 ml zásobného roztoku vitamínov (1000-krát koncentrovaný roztok obsahuje biotín 20 µg, Ca-pantotenát 2 mg, kyselinu listovú 2 µg, inozitol 10 mg, kyselinu nikotínovú 400 µg, riboflavín 200 µg, kyselinu p-aminobenzoovú 200 µg, pyridoxalhydrochlorid 400 µg a tiamínhydrochlorid 400 µg) v 1 dm³. Médium na testovanie smrtiacich vlastností tvorila kompletná pôda a citrát-fosfátový tlmivý roztok (pH od 2,9 do 6,0) [zmiešané v pomere 9:1], s obsahom metylénovej modrej (0,01 %).

Test smrtiacich vlastností ako aj izolácia nukleových kyselín s následnou elektroforézou boli robené metódami popísanými v predchádzajúcej práci [13].

Smrtiace toxíny boli izolované modifikovanou metódou podľa Yamamota [15]. Bunky kultivované v minimálnom médiu na koncentráciu 5 · 10⁷ buniek v 1 ml boli scentrifugované (3000 g, 20 min), supernatant prefiltrovaný cez GF/A membránový nitrocelulózový filter, zahustený na ultrafiltračnom zariadení (peristaltická pumpa a umelá oblička CHIRAPLAT [Chirana]). Z makromolekulej frakcie (zádrže) bola voda odparená na vákuovej odparke (2 h, 30 °C) a toxín vysušený v exikátore pripojenom na olejovú vývevu (1 h). Vysušená vzorka sa rozpustila v čo najmenšom objeme vody alebo vína. Na test aktivity sa použilo dvakrát 10 µl nanesených na sterilné papierové disky (Whatman, 3 MM papier).

Pri odstraňovaní M dsRNA zo smrtiacich kvasiniek sa použila 12 až 15 h kultúra vyrastená v tekutej kompletnej pôde. Asi po 300 buniek z tejto kultúry bolo vysiatych na:

- kompletnú pôdu a kultivovaných pri 37 °C,
- kompletnú pôdu s cykloheximidom (0,3 mg · dm⁻³) a kultivovaných pri 28 °C.

Narastené kolónie boli pretestované na smrtiacu aktivitu na pôde s metylénovou modrou.

Pri použití UV žiarenia na odstránenie M dsRNA bola séria Petriho misiek s kompletnou pôdou naočkovaná inokulom obsahujúcim 10⁵ buniek vystavená účinku UV svetla (germicídna lampa VS 310) zo vzdialenosti 20 cm od zdroja žiarenia po dobu 0, 15, 30, 45 s. Fenotyp vyrastených buniek bol overený na pôde s obsahom metylénovej modrej.

3. VÝSLEDKY A DISKUSIA

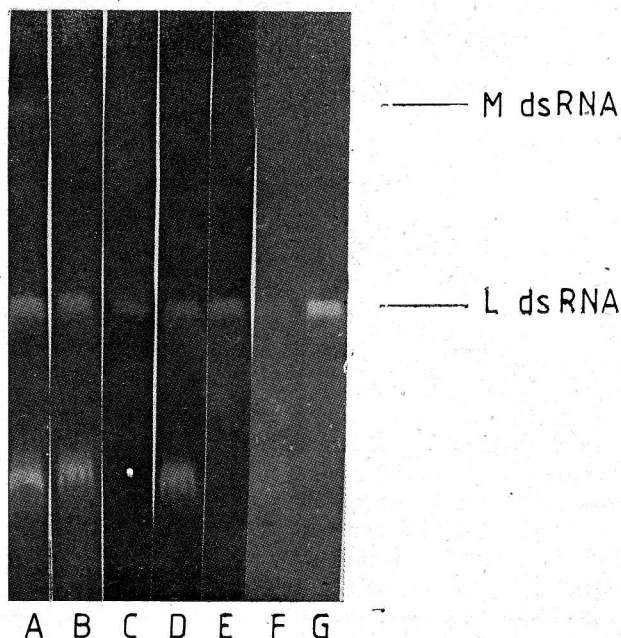
Ako sme spomenuli už v úvode, cieľom našej práce je získať kmene vínnych kvasiniek so smrta-

bielkovinu) [1, 16, 17]. V ďalšej časti práce boli sledované možnosti odstránenia smrtiaceho charakteru zo študovaných kmeňov. V každom experimente sme analyzovali 105 kolónií a zisťovali vplyv cykloheximidu ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), zvýšenej teploty (37°C) a UV žiarenia na zmenu smrtiacich vlastností. U kmeňov K_3 typu sa smrtiaci charakter zvýšenou teplotou a prítomnosťou cykloheximidu eliminuje (tabuľka 2), čo sa prejaví stratou M dsRNA

Tabuľka 2. Vplyv cykloheximidu, teploty a UV žiarenia na stratu smrtiacich vlastností testovaných kmeňov *Saccharomyces* (hodnoty udávajú podiel „nekiller“ kolónií v % z pôvodného počtu 105 analyzovaných kolónií).

Eliminačný faktor	Cykloheximid	UV žiarenie	Teplota 37°C
<i>S. oviformis</i> 10-25-5	11	0	95
<i>S. oviformis</i> 10-25-8	23	0	73

podobne ako u K_1 a K_2 killerov. U kolónií, ktoré uvedeným spôsobom stratili schopnosť produkovať toxín, sme analyzovali nukleové kyseliny gélovou elektroforézou. M dsRNA nebola v týchto bunkách prítomná, čo jednoznačne dokazuje, že smrtiace vlastnosti sú kódované touto formou dsRNA. V kontrolnom experimente vedenom v optimálnych podmienkach si všetky testované kolónie udržali smrtiaci charakter (obr. 2). UV žiarenie produkciu



Obr. 2. Elektroforéza izolovaných nukleových kyselín kmeňov *Saccharomyces* po strate smrtiacich vlastností pôsobením teploty 37°C (B-D), resp. cykloheximidu (E-G).
A — *S. oviformis* 10-25-5 K^+ (kontrola), B — *S. oviformis* 10-25-5 K^- , C — *S. oviformis* 10-25-8 K^- , D — *S. cerevisiae* V 10-13-4 K^- , E — *S. oviformis* 10-25-5 K^- , F — *S. oviformis* 10-25-8 K^- , G — *S. cerevisiae* V 10-13-4 K^- .

smrtiaceho toxínu kvasinkami rodu *Saccharomyces* neovplyvňuje a kmene si smrtiaci charakter zachovávajú.

V poslednej časti práce boli zo smrtiacich kmeňov izolované toxíny a testovaná ich stabilita pri dlhšom uchovávaní v chladničke pri 4°C vo vode a vo víne. Na izoláciu sa použilo ultrafiltračné zariadenie. Koncentrát s toxími bol vysušený odparením. Vysušené toxíny boli rozpustené vo vode, resp. vo víne, nanášané v dvojdňových intervaloch na sterilné papierové disky (dvakrát po $10 \mu\text{l}$) a uložené v miskách obsahujúcich kompletnú pôdu s vrstvou citlivého kmeňa *Saccharomyces cerevisiae* a metylénovú modrú. Smrtiace vlastnosti boli posudzované na základe tvorby inhibičných zón. Aktivita toxínov zostala zachovaná aj po dvojtýždňovom uskladnení pri 4°C (tabuľka 3).

Tabuľka 3. Stabilita smrtiacich toxínov kmeňov *Saccharomyces oviformis* vo vode a vo víne. Veľkosť zón potlačeného rastu na štandardnom citlivom kmeni *Saccharomyces cerevisiae* je udaná v mm.

Doba uskladnenia	0		14 dní	
	voda	víno	voda	víno
<i>S. oviformis</i> 10-25-5	8	8	2	2
<i>S. oviformis</i> 10-25-8	5	5	1	1

Záverom možno zhrnúť, že nájdené kmene vínnych kvasiniek so smrtiacimi vlastnosťami proti *Zygosaccharomyces bailii* majú schopnosť produkovať zymocíny takých fyzikálnochemických parametrov, že je osožné uvažovať príslušné kvasinky ako potenciálne čisté kultúry vo vinárstve, resp. ich využiť pri prenoxe ich smrtiaceho charakteru do priemyselných kmeňov hybridizačnými technikami.

LITERATÚRA

- [1] TIPPER, D. J., BOSTIAN, K. A.: Microbiol. Rev., **48**, 1984, s. 125.
- [2] ZORG, J., KILIAN, S., RADLER, F.: Arch. Microbiol., **149**, 1988, s. 261.
- [3] YOKOMORI, Y., AKIYAMA, H., SHIMIZU, K.: Agric. Biol. Chem., **52**, 1988, s. 2797.
- [4] BENDA, I.: Vitic. Enol. Sci., **44**, 1989, s. 56.
- [5] PFEIFFER, P. et al.: Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1988, s. 1068.
- [6] VONDREJS, V.: Microbiol. Sci., **4**, 1987, s. 313.
- [7] BENDOVÁ, O.: Folia Microbiol., **31**, 1986, s. 422.
- [8] MICHALČÁKOVÁ, S., ŠTURDÍK, E.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 293.
- [9] HARA, S., LIMURA, Y., OTSUKA, K.: Am. J. Enol. Vitic., **31**, 1980, s. 28.
- [10] SEKI, T., CHOI, E. H., RYU, D.: Appl. Environ. Microbiol., **49**, 1985, s. 1211.
- [11] OUCHI, K., NISHIYA, T., AKIYAMA, H.: J. Ferment. Technol., **61**, 1983, s. 631.
- [12] JANDEROVÁ, B., DAVAASURENGIJN, T., BENDOVÁ, O.: Folia Microbiol., **31**, 1986, s. 339.
- [13] MICHALČÁKOVÁ, S. et al.: Kvas. prům., **36**, 1990, s. 8.

- [14] MICHALČÁKOVÁ, S., ŠTURDÍK, E.: Kvas. prům., **36**, 1990.
- [15] YAMAMOTO, T., UCHIDA, K., HIRATANI, T.: J. Antibiot., **41**, 1988, s. 398.
- [16] WICKNER, R. B. in The Molecular Biology of the Yeast: Saccharomyces, Life Cycle and Inheritance (Strathern, J. N., Jones, E. W., Broach, R. J., eds.), Cold Spring Harbor 1981.
- [17] YOUNG, T. W., YAGIU, M.: Ant. van Leeuwenhoek, **44**, 1978, s. 459.

Michalčáková, S. - Šturdík, E. - Sulo, P.: Štachtenie vínnych kvasiniek. IV. Selekcja a vlastnosti smrťiacich kmeňov. Kvas. prům., **36**, 1990, č. 10—11, s. 301—304.

Prieskumom 63 zbierkových kmeňov vínnych kvasiniek rodu *Saccharomyces* bolo nájdených 5 producentov „killer“ toxínov so stabilitami a pH profilmi vhodnými pre použitie na potlačanie kvasiniek rodu *Zygosaccharomyces* ako obávaných kontaminantov fľašového vína. Boli študované genetické determinanty kódujúce smrťiace toxíny s cieľom využiť získané poznatky pri prenose smrťiacich vlastností do priemyselných kmeňov vínnych kvasiniek.

Михалчакова, С. - Штурдик, Э - Суло, П.: Селекция винных дрожжей. IV. Селекция и свойства смертоносных штаммов. Квас. прум., **36**, 1990, № 10—11, стр. 301—304.

При исследовании 63 коллекционированных штаммов винных дрожжей типа *Saccharomyces* было найдено пять продуцентов «киллер» токсинов с стабильностью и pH профилями, подходящими для подавления дрожжей

типа *Zygosaccharomyces*, опасение вызывающих контаминантов бутылочного вина. Изучались генетические детерминанты — коды смертоносных токсинов с целью использования полученных сведений при переносе смертоносных свойств в промышленные штаммы винных дрожжей.

Michalčáková, S. - Šturdík, E. - Sulo, P.: Improvement of Wine-Making Yeasts. IV. Selection and Properties of Killer Strains. Kvas. prům., **36**, 1990, No. 10—11, pp. 301—304.

From 63 wine-making yeast strains of *Saccharomyces* (from the collection) five strains produced killer toxins being stable and having suitable pH values for the suppression of *Zygosaccharomyces* yeasts that belong among apprehensive contaminants of bottled wines. The genetic determinants coding the killer toxins were studied with the aim to transfer the killer properties into industrial strains of wine-making yeasts.

Michalčáková, S. - Šturdík, E. - Sulo, P.: Züchtung von Weinhefen. IV. Selektion und Eigenschaften der Killer-Stämme. Kvas. prům., **36**, 1990, Nr. 10—11, S. 301—304.

Bei der systematischen Überprüfung von 63 Sammlungs-Hefe-Stämmen des Genus *Saccharomyces* wurden 5 Produzenten von „Killer-Toxinen“ mit Stabilitäten und pH-Profilen gefunden, die geeignet für die Anwendung als Inhibitoren der *Zygosaccharomyces*-Hefen — der befürchteten Kontaminanten von Flaschenweinen erscheinen. Es wurden die genetischen Determinanten, die die Killertoxine kodieren, studiert, mit dem Ziel der Applikation der gewonnenen Erkenntnisse bei dem Transfer der Killer-Eigenschaften auf die industriellen Weinhefestämme.

Frakcionácia kvasničnej biomasy. V. Výroba a využitie preparátov invertázy

693.14

Ing. R. KOLLÁR, Doc. Ing. E. ŠTURDÍK, CSc., Ing. M. GALKOVÁ, Ing. S. GOČOVÁ, Katedra biochemickej technológie CHTF SVŠT, 812 37 Bratislava

Kľúčové slová: pekárské drożdże, frakcionácia biomasy, získavanie a aplikácia invertázy, autolýza kvasiniek

ÚVOD

Invertáza (β -fruktofuranozidáza, E. C. 3.2.1.26) je hydroláza katalyzujúca rozklad sacharózy na glukózu a fruktózu, čo sa využíva predovšetkým v cukrovinkárstve na zlepšenie konzistencie čokoládových cukríkov s fondánovou náplňou, v nápojovom priemysle pri výrobe glukózo-fruktózových sirupov, v pekárstve na zlepšenie pórovitosti a zvýšenie arómy pečiva, v poľnohospodárstve na prípravu cukorného krmiva pre včelstvá v zimnom období a napokon pri konštrukcii biochemických analyzátorov (enzýmových elektród a termistorov) [1—5].

Enzým sa izoluje z pekárskeho droždía viacerými postupmi, ktorých podstata spočíva v rozrušení bunkového obalu a uvoľnení invertázy z kvasiniek, pričom z bunkového extraktu sa finálny produkt získa precipitáciou s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, resp. s organickými rozpúšťadlami [6]. V priemyselných podmienkach sa na uvoľnenie enzýmu z buniek najčastejšie využíva iniciovaná autolýza doplnená

v závere pôsobením horúceho toluénu [7—9]. Pre doteraz popísané spôsoby získavania invertázy je typické, že ide o tzv. „sólo“ izolácie, teda postup je optimalizovaný tak, aby sa zo vstupnej suroviny získal maximálny výťažok enzýmu.

Na našom pracovisku bol vypracovaný postup komplexnej frakcionácie kvasničnej biomasy umožňujúci vyrobiť z jednej šarže viacero preparátov. Z droždía sa tak dá získať súčasne kvasničný extrakt, nukleotidy, ergosterol, fosfolipidy, bunkové steny, glukany a invertáza [10]. V predchádzajúcich článkoch, charakterizujúcich zmienenu stratégiu, sme popísali spôsob uvoľňovania cytoplazmatického obsahu kvasiniek indukovanou autolýzou, ktorá sa využíva na rozrušenie bunkového obalu [11], ďalej získavanie hrubých preparátov z autolýzátu pekárskeho droždía [12], resp. izoláciu a využitie frakcie lipidov [13]. Tento článok je venovaný problematike získavania invertázy v rámci komplexnej frakcionácie droždía a využitia (odskúšania) získaných preparátov v našich podmienkach.