

Šľachtenie vínnych kvasiniek

V. Príprava priemyselných kmeňov so smrtiacimi vlastnosťami

Ing. SOŇA MICHALČÁKOVÁ^a, Ing. PAVOL SULO, CSc.^b, doc. Ing. ERNEST ŠTURDÍK, CSc.^a, Ing. LUBO-MÍR VÍTEK^c, Ing. DAGMAR DRGOŇOVÁ^c

^a Chemickotechnologická fakulta SVŠT, 812 37 Bratislava

^b Ústav biotechnológie SVŠT, 812 37 Bratislava

^c Komplexný výskumný ústav vinohradnícky a vinársky, 833 11 Bratislava

Kľúčové slová: *vínne kvasinky, smrtiace toxíny, fúzia protoplastov, respiračne deficitné mutanty, smrtiace kvasinky*

1. ÚVOD

Čisté kultúry selektovaných vínnych kvasiniek majú dôležitú úlohu v procese biologickej regulácie a riadenia fermentácie hroznového muštu [1, 2]. Pri spontánnej fermentácii muštu sa rozmnožujú prakticky všetky mikroorganizmy, ktoré sa doň z hrozna dostávajú. Pri tom sa môže stať, že nežiadúce kvasinky spôsobia neželaný priebeh fermentácie. Spontánne kvasenie možno nahradiť kontrolovaným, a to použitím čistej kultúry vínnych kvasiniek, ktorá bola selektovaná alebo pripravená pre určité podmienky a potreby praxe.

Cieľom našej práce bolo technikou fúzie protoplastov pripraviť také priemyselné kmene vínnych kvasiniek, ktoré by boli odolnejšie voči vzniku kontaminácie a zároveň by nestratili pôvodné technologické vlastnosti. Práca nadväzuje na známe poznatky prezentované i v predchádzajúcich číslach tohto časopisu [3–10].

2. MATERIÁLY A METÓDY

Pre prácu sme použili 5 priemyselných kmeňov vínnych kvasiniek (*Saccharomyces oviformis* Myslenice 1, Bratislava 1, 74/F, 76/D, *Saccharomyces cerevisiae* Hliník 1; tabuľka 1) a 2 štandardné kmene — smrtiaci *Saccharomyces cerevisiae* T3DCII MAT α , ade⁻ ura⁻ leu⁻, K₁⁺R₁⁺, zo zbierky ÚFHZ SAV z Ivánky pri Dunaji) a citlivý kmeň *Saccharomyces cerevisiae* S6/1 (MAT α , K⁻R⁻, poskytnutý dr. Vondrejsom PF UK Praha). Priemyselné kmene pochádzali zo zbierky Komplexného výskumného ústavu vinohradníckeho a vinárskeho v Bratislave.

Smrtiace vlastnosti kvasiniek sme testovali na kompletnej pevnej pôde obsahujúcej citrát-fosfátový tlmivý roztok pH = 4,5 a metylénovú modrú (0,01 %) s náterom citlivého, resp. smrtiaceho kmeňa (10⁵ buniek na Petriho miskú). Testované kmene boli nanášané vo forme okrúhlejšej kolónie sterilným špáradlom a smrtiace vlastnosti sme určili na základe tvorby zóny potlačeného rastu.

Respiračne deficitné mutanty sme pripravili kultiváciou s etídiumbromidom (25 μ mol. dm^{-3}) [3]. Protoplasty kvasiniek boli získané pomocou zmesi lytických enzýmov z hepatopankreasu slimáka záhradného [11] s použitím 0,6 mol. dm^{-3} KCl ako osmotického stabilizátora. Fúzia protoplastov bola indukovaná polyetylén glykolom (Mh = 4 000). Fenotyp cybridov bol určený na syntetických pôdach obsahujúcich 500 μ mol. dm^{-3} CuSO₄ [Cup^R], 1,5

$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ cykloheximidu [Cyh^S], resp. na kompletnej pôdach (1% kvasničný autolýzát, 1% peptón) s 3% glycerolom obsahujúcich erytromycín [E; 4 mg. ml^{-1}] alebo chloramfenikol [C; 4 mg. ml^{-1}].

Ploidia kvasiniek bola určená nepriamo na základe obsahu DNA v bunke po extrakcii a stanovení DNA difenylamínovým činidlom metódou podľa Burtona [12].

Fermentačné testy sme realizovali v 250 ml hroznového priživeného muštu (obsah redukujúcich sacharidov 198 g. dm^{-3}) po inokulácii 5 obj. % (10⁶–10⁷ buniek v 1 ml) v bankách s kvasným uzáverom. Po zaliatí zátok parafínom a naplnení kvasných uzáverov glycerínom bol zaznamenávaný v 1 až 2 dňových intervaloch úbytok hmotnosti (uvolený CO₂). Po 25 dňoch bola urobená analýza prekvasených muštov v Komplexnom výskumnom ústave vinohradníckom a vinárskom v Bratislave metódami bežne používanými vo vinárskych laboratóriách [13]. Zvyškové redukujúce sacharidy boli stanovené titračne podľa Schoorla, obsah etanolu po oddestilovaní oxidometricky. Organické a prchavé kyseliny boli určené titračne, celkový extrakt po oddestilovaní alkoholu nepriamo podľa ČSN 56 0216.

3. VÝSLEDKY A DISKUSIA

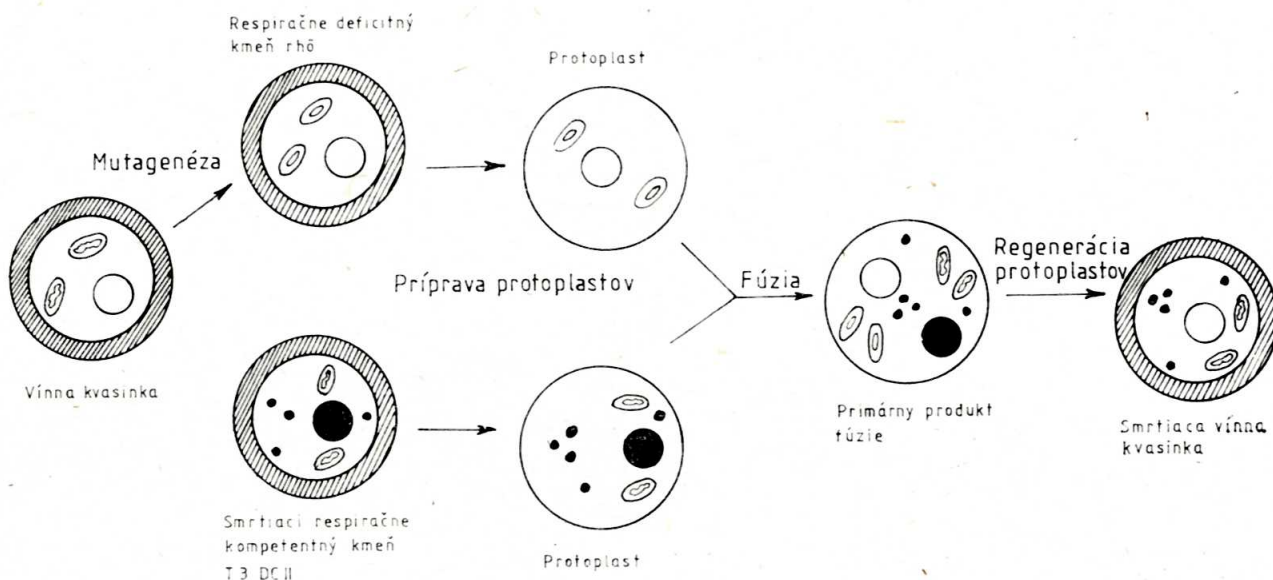
Tabuľka 1 sumárne uvádza charakteristiky vý-

Tabuľka 1. Charakteristické vlastnosti pôvodných kmeňov vínnych kvasiniek

Kmeň	Ploidia	Fenotyp		
		jadrový	cytoplazmatický	
S.o. Bratislava 1	2n	Cup ^R Cyh ^S	rho +	C ^S E ^S K ⁻ R ⁻
S.o. 76/D	2n	Cup ^R Cyh ^S	rho +	C ^S E ^S K ⁻ R ⁻
S.o. 74/F	2n	Cup ^R Cyh ^S	rho +	C ^S E ^S K ⁻ R ⁻
S.o. Myslenice 1	3n	Cup ^R Cyh ^S	rho +	C ^S E ^S K ⁻ R ⁻
S.o. Hliník 1	2n	Cup ^R Cyh ^S	rho +	C ^S E ^S K ⁻ R ⁺

chodzích priemyselných kmeňov vínnych kvasiniek [4]. Všetky kmene s výnimkou *S. oviformis* Hliník 1, ktorý je neutrálny (K⁻R⁺) patria k citlivým kmeňom (K⁻R⁻). Neodlišujú sa ani v rezistencii k medi a antibiotikám.

Na prípravu priemyselných smrtiacich kmeňov bola použitá technika fúzie protoplastov (obr. 1), pričom selekciu cybridov (hybrid s jadrom jedného z rodičovských kmeňov a cytoplazmou oboch rodičov) umožňovala respiračná deficiencia použitých priemyselných kmeňov kvasiniek. Respiračne deficitné mutanty (rho⁻) boli pripravené kultivá-



Obr. 1. Schéma prípravy smrtiacich vínnych kvasiniek fúziou protoplastov.

ciou východzích kmeňov v kompletnej pôde s etídiumbromidom, pričom frekvencia vzniku rho⁻ mutácie (tj. podiel nedýchajúcich z pôvodne použitých kolónií) sa pohybovala v rozmedzí 95 až 99 %. Donorom smrtiaceho charakteru bol kmeň *S. cerevisiae* T3DCII produkujúci toxín K1 typu a vyznačujúci sa viacerými mutáciami (auxotrofia na adenín, leucín, uracil). To znemožňuje jeho rast na syntetickej pôde s akýmkoľvek zdrojom uhlíka bez prídavku týchto látok. Fúziou protoplastov získané cybridy sme selektovali na minimálnom médiu s 3% glycerolom a 0,1% glukózou stabilizovanom s KCl [0,6 mol.dm⁻³]. Respiračne deficitné technologické kmene tvorili na tejto pôde mikroskopické kolónie, kým cybridy vínnych kvasiniek so smrtiacim charakterom a mitochondriami z respirujúceho kmeňa T3DCII získali schopnosť rásť na glycerole a po 7 až 10 dňoch vytvorili výrazné kolónie. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 2.

Tabuľka 2. Frekvencia fúzie protoplastov technologických kmeňov a štandardného smrtiaceho kmeňa

Fúzané kmene	Frekvencia fúzie	
	A	B
S. o. Bratislava 1 rho ⁻ x S. c. T3DCII	9.10 ⁻⁶	2,3.10 ⁻⁴
S. o. 76/D rho ⁻ x S. c. T3DCII	6.10 ⁻⁷	4,6.10 ⁻⁵
S. o. 74/F rho ⁻ x S. c. T3DCII	8.10 ⁻⁶	1,1.10 ⁻⁵
S. o. Myslenice 1 rho ⁻ x S. c. T3DCII	1.10 ⁻⁵	2,2.10 ⁻⁵
S. c. Hliník 1 rho ⁻ x S. c. T3DCII	1.10 ⁻⁵	2,5.10 ⁻⁵

A — vzhľadom na celkový počet protoplastov recipienta
B — vzhľadom na počet regenerovaných protoplastov

V ďalších experimentoch sme sa zamerali na charakterizáciu základných genetických i technologických vlastností získaných kmeňov (tabuľka 3). Produkty fúzie až na *S. cerevisiae* Hliník K1 mali rovnakú ploidiu a jadrový fenotyp ako pôvodné vínne kvasinky a získali cytoplazmatický fenotyp donorového kmeňa. To znamená, že boli prototrofné, dýchajúce, vykazovali aktivitu voči citlivému kmeňu i voči smrtiacemu kmeňu typu K2, pričom

boli rezistentné voči smrtiacemu toxínu typu K1. Všetky pripravené kmene si udržiavali smrtiaci charakter i po viacnásobnom preočkovaní a uchovávaní počas jedného roka.

Tabuľka 3. Charakteristické vlastnosti rodičovských kmeňov a produktov fúzie

Donor:			
S. c. T3DCII	n	Cup ^R Cy ^S	Ade ⁻ Ura ⁻ Leu ⁻
Recipient:			rho + C ^{RER} K ⁺ R ⁺
S. o. Bratislava 1 rho ⁻	2n	Cup ^R Cy ^S	rho ⁻ K ⁻ R ⁻
S. o. 76/D rho ⁻	2n	Cup ^R Cy ^S	rho ⁻ K ⁻ R ⁻
S. o. 74/F rho ⁻	2n	Cup ^R Cy ^S	rho ⁻ K ⁻ R ⁻
S. o. Myslenice 1 rho ⁻	3n	Cup ^R Cy ^S	rho ⁻ K ⁻ R ⁻
S. c. Hliník 1 rho ⁻	2n	Cup ^R Cy ^S	rho ⁻ K ⁻ R ⁺
Produkty fúzie:			
Bratislava 1 K1	2n	Cup ^R Cy ^S	rho + C ^{RER} K ⁺ R ⁺
76/D K1	2n	Cup ^R Cy ^S	rho + C ^{RER} K ⁺ R ⁺
74/F K1	2n	Cup ^R Cy ^S	rho + C ^{RER} K ⁺ R ⁺
Myslenice 1 K1	3n	Cup ^R Cy ^S	rho + C ^{RER} K ⁺ R ⁺
Hliník 1 K1	3n	Cup ^R Cy ^S	rho + C ^{RER} K ⁺ R ⁺

Použité skratky:

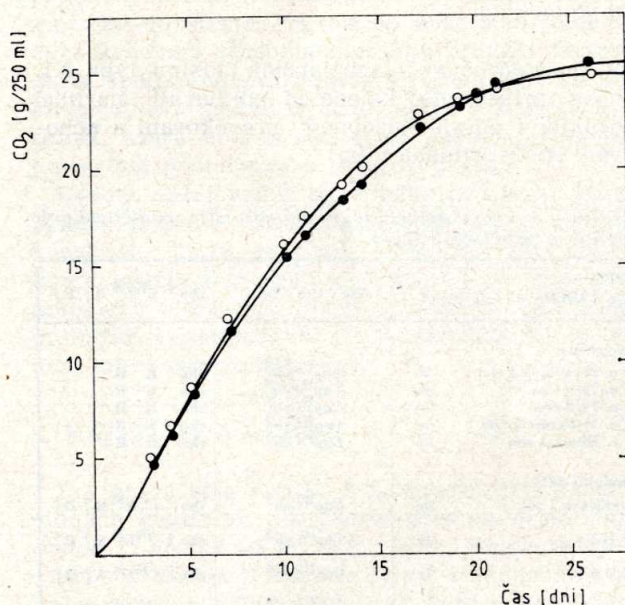
n — haploid, 2n — diploid, 3n — triploid, Cup^R — rastie na pôdach s obsahom 500 μmol.dm⁻³ CuSO₄, Cy^S — citlivý na prítomnosť cykloheximidu v pôde, C^S — citlivý na chloramfenikol, E^S — citlivý na erytromycín, K⁺R⁺ — smrtiaci kmeň, K⁻R⁺ — neutrálny kmeň, K⁻R⁻ — citlivý kmeň, rho⁻ — respiračne deficitný kmeň
Ade⁻Ura⁻Leu⁻ — vyžadujúci prítomnosť adenínu, uracilu, leucínu v pôde

Keďže cieľom práce bolo pripraviť genetickými metódami priemyselné smrtiace kmene tak, aby si zachovali pôvodné, aplikačne dôležité vlastnosti ako sú hĺbka prekvasenia, produkcia etanolu, tvorba organických kyselín a podobne, v ďalšej časti práce sme sa zamerali na ich otestovanie. Laboratórne skúšky ukázali, že prenesením cytoplazmy donorového kmeňa do vínnych kvasiniek nedošlo k výraznej zmene technologických vlast-

Tabuľka 4. Analýza hroznového muštu po 25-dňovej fermentácii pôvodnými a smrtiacimi kmeňmi testovaných vinných kvasiniek

Použitý kmeň	Obsah alkoholu (obj. %)	Celkový extrakt (g. dm ⁻³)	Zvyškové reduk. sacharidy (g. dm ⁻³)	Titrova-telné kyseliny (g. dm ⁻³)	Preháv. kyseliny (g. dm ⁻³)	pH
Hliník 1	12,29	27,4	11,8	3,8	0,61	3,05
K1	10,83	45,5	30,8	4,05	0,25	2,74
Myslenice 1	12,20	27,6	10,6	4,2	0,43	2,81
Myslenice 1 K1	12,46	24,8	6,6	4,05	0,52	2,93
Bratislava 1	11,42	45,2	26,0	3,9	0,64	3,02
Bratislava 1 K1	12,20	26,3	9,8	3,45	0,52	2,99
76/D	11,85	34,4	16,2	4,2	0,41	2,15
76/D K1	12,20	31,8	14,4	3,75	0,55	3,02
74/F	9,74	49,8	23,2	3,8	0,54	2,99
74/F K1	12,11	31,5	12,2	3,8	0,46	2,97

ností ani rýchlosti fermentácie (tabuľka 4, obr. 2). Získané kmene by teda mohli nájsť uplatnenie pri štúdiu fermentácií pomocou čistých kultúr. Vhod-



Obr. 2. Priebeh kvasenia hroznového muštu kmeňmi *Saccharomyces oviformis* Myslenice 1 (○) a Myslenice 1 K1 (●) za anaeróbných podmienok pri 25 °C.

nosť ich použitia vo väčšom merítke by bolo však potrebné overiť v reálnej praxi.

Medzi vinnými kvasinkami izolovanými z hrozna, muštu či mladých vín patriacich do rodu *Saccharomyces* neboli zatiaľ u nás popísané izoláty produkujúce smrtiaci toxín typu K1. Vyskytujú sa medzi nimi len kmene typu K2, resp. K3, ktoré sú účinné na typ K1 a naopak [4].

Uvedené technologické kmene tvoriace K1 toxín by sa tiež mohli uplatniť pri mikrobiologickom štúdiu fermentácií pomocou čistých kultúr, najmä pri riešení problémov týkajúcich sa konkurencie kultúrnych kvasiniek a prirodzených kontaminantov vína. Kvasinky čistej kultúry sa dajú jednoducho odlíšiť od divých po zriadení a výseve vhodného množstva buniek na tuhé pôdy. Kultúrne kvasinky po prenesení na testovacie pôdy s vrstvou citlivé-

ho kmeňa vytvoria zóny potlačeného rastu, naproti tomu na pôdach s vrstvou kmeňa K1 typu zóny nevytvoria. Kontaminujúce kvasinky vytvoria zóny buď na oboch náteroch (kvasinky *S. cerevisiae* produkujúce K2 a K3 toxín, resp. iné kvasinky so smrtiacou aktivitou) alebo zóny na oboch náteroch nevytvoria (kvasinky nevykazujú smrtiacu aktivitu).

Literatúra

- [1] MALÍK, F., et al.: Kvas. prům., **32**, 1986, s. 29.
- [2] MALÍK, F.: Biologische und biotechnische Steuerung des Gärungsprozesses, Protokolle zum 16. Internationalen Weinchemischen Kolloquium, Modra 1989, s. 7.
- [3] MICHALČÁKOVÁ, S., ŠTURDÍK, E.: Kvas. prům., **36**, 1990, s. 196.
- [4] MICHALČÁKOVÁ, S., et al.: Kvas. prům., **36**, 1990, s. 6.
- [5] MICHALČÁKOVÁ, S., ŠTURDÍK, E.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 293.
- [6] SEKI, T., CHOI, E. H., RYU, D.: Appl. Environ. Microbiol., **49**, 1985, s. 1211.
- [7] HARA, S., IIMURA, Y., OTSUKA, K.: Am. J. Enol. Vitic., **31**, 1980, s. 28.
- [8] RADLER, F., SCHMITT, M.: J. Food Protec., **50**, 1987, s. 234.
- [9] SCHIMIZU, K. et al.: J. Ferment. Technol., **63**, 1985, s. 421.
- [10] BENDA, I.: Vitic. Enol. Sci., **44**, 1989, s. 56.
- [11] SULO, P.: Štúdium prenosu mitochondriálneho génu, fúzie a transformácie pomocou cytoplazmatických mutantov *S. cerevisiae* [Kandidátska dizertačná práca], ÚFHZ SAV Ivánka pri Dunaji 1987.
- [12] BURTON, K.: Biochem. J., **62**, 1956, s. 315.
- [13] MINÁRIK, E., NAVARA, A.: Chémia a mikrobiológia vína, Príroda, Bratislava 1986.

Lektoroval doc. Ing. E. Minárik, DrSc.

Michalčáková, S. - Sulo, P. - Šturdík, E. - Vítek, L. - Drgoňová, D.: Šľachtenie vinných kvasiniek. V. Príprava priemyselných kmeňov so smrtiacimi vlastnosťami. Kvas. prům., **37**, 1991, č. 2, s. 44–47.

V práci bola využitá technika fúzie protoplastov na prípravu piatich priemyselných kmeňov vinných kvasiniek rodu *Saccharomyces* so smrtiacim charakterom K1 typu. Získané kmene si stabilne udržiavali smrtiaci charakter. Laboratórne skúšky potvrdili, že nestratili ani aplikačne významné technologické vlastnosti. Po úspešných poloprevádzkových testoch by mohli rozšíriť spektrum čistých kultúr pre použitie vo vinárskej praxi.

Михалчакова, С. - Суло, П. - Штурдик, Е. - Витек, Л. - Дргоňова, Д.: Селекция винных дрожжей. V. Приготовление промышленных штаммов с смертельными свойствами. Квас. прум., **37**, 1991, № 2, стр. 44–47.

В работе была применена методика фузии протопластов для приготовления пяти промышленных штаммов винных дрожжей семейства *Saccharomyces* с смертельным характером K1 типа. Полученные штаммы стабильно выдерживали смертельный характер. Лабораторные испытания подтвердили, что они не потеряли ни прикладно значительные технологические свойства. После успешных полупроизводственных экспериментов они могут расширить спектр чистых культур с целью применения в практике виноделия.

Michalčáková, S. - Sulo, P. - Šturdík, E. - Vítek, L. - Drgoňová, D.: Improvement of Wine-Making Yeasts. V. Preparation of Industrial Strains with Killing Properties. Kvas. prům., **37**, 1991, No. 2, pp 44–47.

The protoplast fusion for a preparation of five industrial strains of wine-making yeasts from the genus *Saccharomyces* with the killing effect K1 type was used. The strains obtained had stable killing character-

ristics together with their original technological properties. After successful pilot-plant tests the new strains could be incorporated among other pure cultures applied in wine-making.

Michalčáková, S. - Sulo, P. - Šturdík, E. - Vítek, L. - Drgoňová, D.: Züchtung von Weinhefen. V. Zubereitung industrieller Stämme mit Killer-Eigenschaften. Kvas. prům., 37, 1991, Nr. 2, S. 44—47.

In der Arbeit wurde die Technik der Protoplaste-Fusion zur Zubereitung von 5 industriellen Stämmen der Weinhefen Generis *Saccharomyces* mit Killer-Charakter Typ K1 angewandt. Die gewonnenen Stämme behielten den Killer-Charakter als stabile Eigenschaft. Durch Laborversuche wurde bestätigt, daß sie auch die applikationswichtige technologische Eigenschaften nicht verloren haben. Nach positiven Halbbetriebstesten könnten die beschriebenen Stämme das Spektrum der Reinkulturen für die Praxis der Weinindustrie ausweiten.