



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

225 279

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 16 04 82
(21) PV 2750-82

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/16

(40) Zveřejněno 27 05 83
(45) Vydáno 01 07 85

(75)
Autor vynálezu

BENDO VÁ OLGA PhMr. RNDr. prof. DrSc.

VERNEROVÁ JANA ing. CSc.

JANDEROVÁ BLANKA RNDr. CSc.

VONDREJS VLADIMÍR RNDr. CSc., PRAHA

KUPCOVÁ LUDMILA

(54) Pivovarský kmen *Saccharomyces uvarum* P9-LK12/1

1

Vynález se týká pivovarského kmene kvasinek *Saccharomyces uvarum* P9-LK12/1, vhodného pro výrobu biologicky stabilních piv bez pasteurace. Tento kmen produkuje bílkovinný faktor účinný proti řadě druhů kvasinek rodu *Saccharomyces*. Produkce faktoru a resistance k němu umožňuje, aby tento kmen eliminoval případnou kontaminaci divokými kmeny kvasinek rodu *Saccharomyces*, která zhoršuje kvalitu kvasných produktů.

Řada kvasinek je schopna produkovat tyto faktory, které působí jako mykocíny na řadu příbuzných druhů kvasinek. Produkce faktoru je determinována dvojřetězcovou ribonukleovou kyselinou (RNA), přítomnou v cytoplasmě příslušných kmenů. Na reprodukci a vyjádření genetické informace této ribonukleové kyseliny se navíc podílí řada chromozomálních genů. Uvedenou kyselinu lze přenášet pouze konjugací buněk, cytodukcí či indikovanou fúzí protoplastů.

Při konstrukci kmene podle vynálezu byla použita metoda indukované fúze protoplastů, která umožnila hybridizaci haploidního kmene *Saccharomyces cerevisiae* T 158C (α , his⁻, producent faktoru, resistant k faktoru) s polyploidním pivovarským kmenem *Saccharomyces uvarum* P9. Tento kmen je citlivý na faktor druhého rodičovského kmene. Po reversioni hybridních protoplastů na normální buňky a selekci na minimálním mediu

s faktorem byl získán velký počet hybridních klonů, které produkovaly faktor, byly k němu resistantní a schopny růstu bez přítomnosti histidinu. Průměrný obsah kyseliny desoxyribonukleové (DNA) a objem hybridních buněk vybraných klonů byl větší než u výchozích rodičovských kmenů. Růstová rychlost vybraných hybridů v exponenciální fázi růstu byla srovnatelná s rodičovskými kmeny. Vybrané hybridní kmeny byly podrobeny pasážování na mladině. Monokloniové izoláty byly testovány a mezi nimi byl nalezen stabilní hybridní klon *Saccharomyces uvarum* P9-LK12/1 s vysokou produkcí účinného faktoru, který navíc vykazoval stupeň prokvašení mladiny, sedimentaci a další industriálně významné vlastnosti shodné s výchozím industriálním kmenem *Saccharomyces uvarum* P9.

Charakteristika kmene *S. uvarum* P9-LK-12/1 spočívá v tom, že produkuje killer faktor a je resistantní ke killer faktoru typu T 158 C. Buňky má nesporelující a tvaru elipsoidu, přičemž délka činí $8,5 \pm 1,2$ μ m a šířka $7 \pm 1,2$ μ m, čímž se získají stacionární buňky v 8 % sladinně kultivované při 28 °C. Tyto se množí pučením, obsah desoxyribonukleové kyseliny ve stacionární buňce je více než třikrát větší než u haploidního rodiče *S. cerevisiae* T 158 C. Stacionární buňky jsou jednojaderné. Generační doba exponenciální kultury v komplexním mediu při 28 °C činí 114 ± 7 min.

Získaný kmen *Saccharomyces uvarum* P9-LK12/1, uložený ve sbírce mikroorganismů katedry genetiky, mikrobiologie a biofyziky přírodovědecké fakulty University Karlovy v Praze pod číslem LK12/1, lze s výhodou použít jako produkční kmen pro kvasný proces a to zejména tehdy, hrozí-li kontaminace divokými kmeny kvasinek rodu *Saccharomyces*.

Vynález je blíže objasněn na konkrétním příkladu eliminace masivní kontaminace mladiny kvasinkami *Saccharomyces bayanus*.

Kmen kvasinek *Saccharomyces uvarum* P9-LK12/1 byl vyveden standardním způsobem z laboratorní kultury do mladiny ve standardních kvasných válcích. Kultura byla kontaminována kmenem *Saccharomyces bayanus* tak, že 10 % celkového množství inokula tvořily kontaminantní buňky. Kvašení probíhalo způsobem spodního pivovarského kvašení při teplotě 6 až 10 °C. Vzorky byly odebírány každý den a v mediu byl stanovován počet buněk hybridního a kontaminantního kmene. Již po dvou dnech společné kultivace byly buňky kontaminantního kmene z kultury prakticky eliminovány. Zatímco v kontrolním experimentu, ve kterém byl rodičovský pivovarský kmen *Saccharomyces uvarum* P9 (neprodukující faktor) kultivován v přítomnosti stejného množství kontaminantního kmene se buňky obou kmenů množily a buněk kmene *Saccharomyces bayanus* v kultuře rychle přibývalo.

Obdobná eliminace buněk kontaminace hybridním kmenem *S. uvarum* P9-LK12/1 byla u dalších kmenů citlivých druhů kvasinek rodu *Saccharomyces*. Spektrum citlivosti na faktor se kryje se spektrem účinnosti původního rodičovského kmene *Saccharomyces cerevisiae* T 158C (α , his⁻, faktor produkující). Hybridní kmen dokonce vykazuje ve srovnání s rodičovským kmenem T 158C vyšší intenzitu efektu, jak bylo demonstrováno standardním zónovým testem.

Dále je uveden příklad reprodukovatelného postupu šlechtění. Indukovaná fúze protoplastů kmene *S. cerevisiae* T 158 C a *S. uvarum* P9 probíhala v 30 % polyethylenglykolu a 0,3 M CaCl_2 . Selektce hybridů probíhala souběžně s reversí protoplastů v minimálním osmoticky stabilizovaném mediu (agarové plotny) při 28 °C dva dny. Potom byl na povrch agaru rozetřen killer faktor, 0,2 ml media (po kultivaci kmene *S. cerevisiae* T 158 C tři dny), ze kterého byly odstraněny buňky filtrací přes membránový filtr. Mezi hybridními klony vyrostlými na tomto mediu při 20 °C, byly vybrány ty, které produkovaly nejvíce killer faktoru, dále byly pasážovány opakovaně na 8 % mladině při 7 °C a vysety na kompletní agarové medium. Monokloniové izoláty byly testovány z hlediska pivovarsky významných vlastností, zejména sedimentace a prokvašení mladiny. Byl vybrán kmen, který produkoval killer faktor, byl k němu resistantní a nejvíce se blížil rodičovskému kmenu *S. uvarum* P9 s pivovarsky významnými vlastnostmi.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Pivovarský kmen *Saccharomyces uvarum* P9-LK12/1.