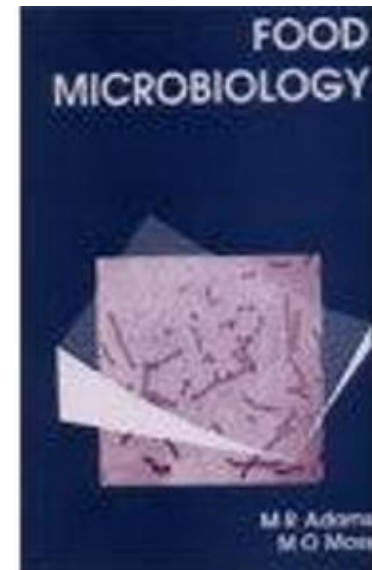
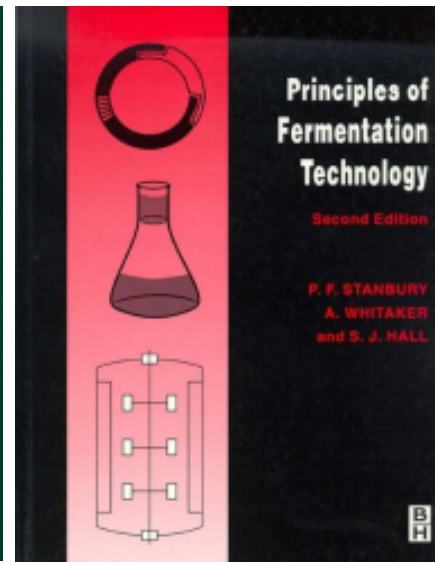
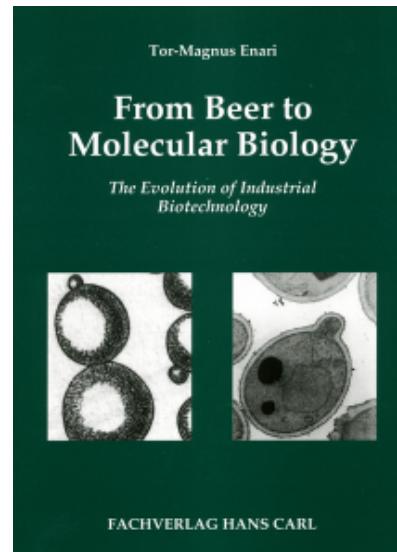
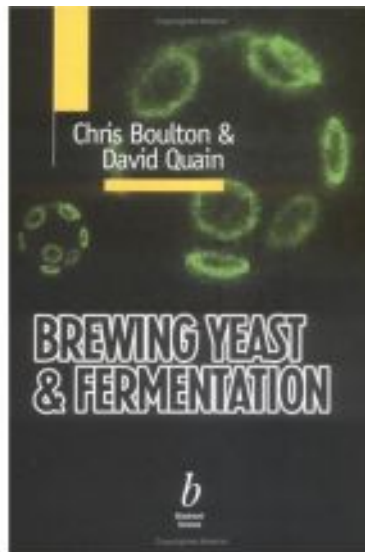
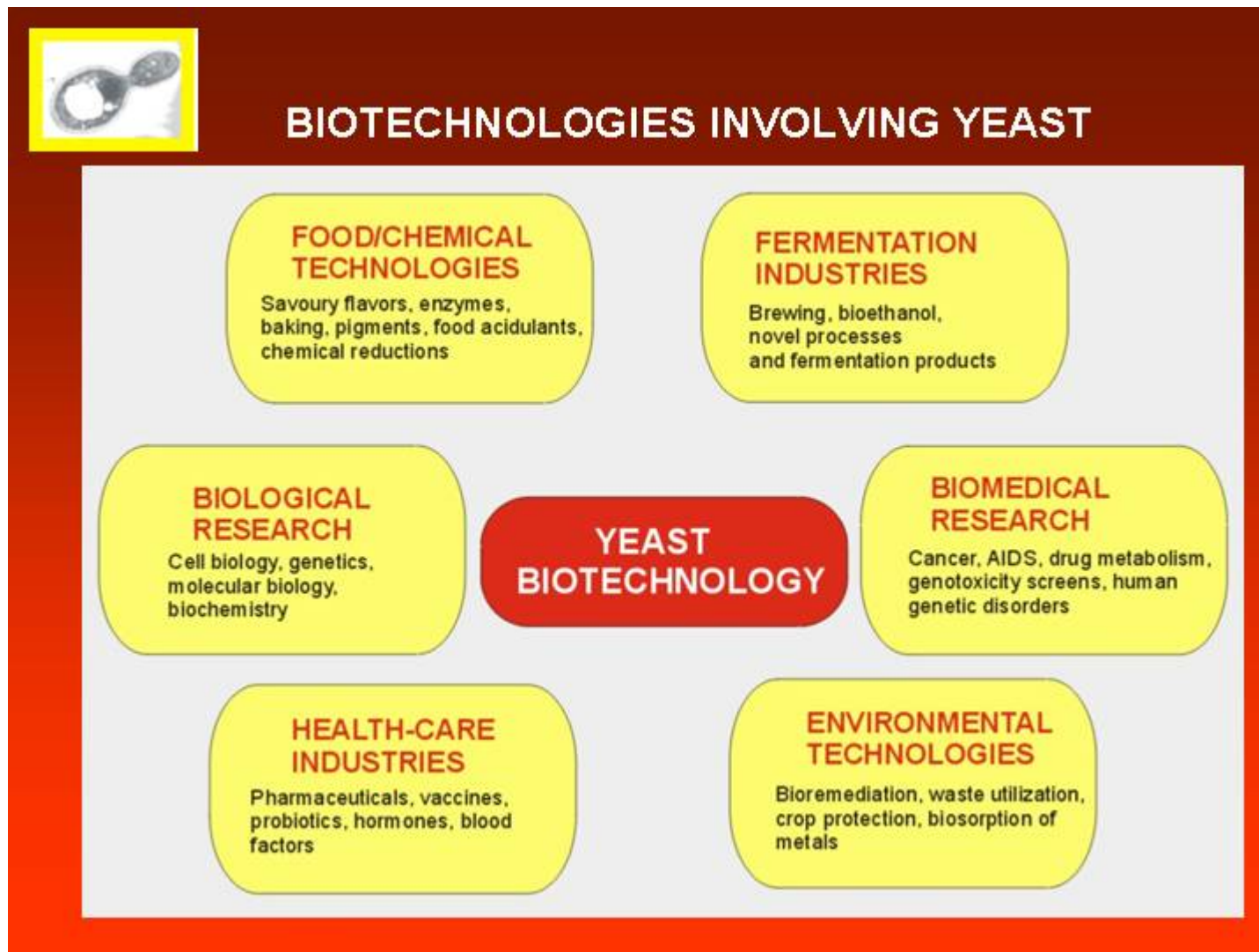


Kvasinky a biotechnologie

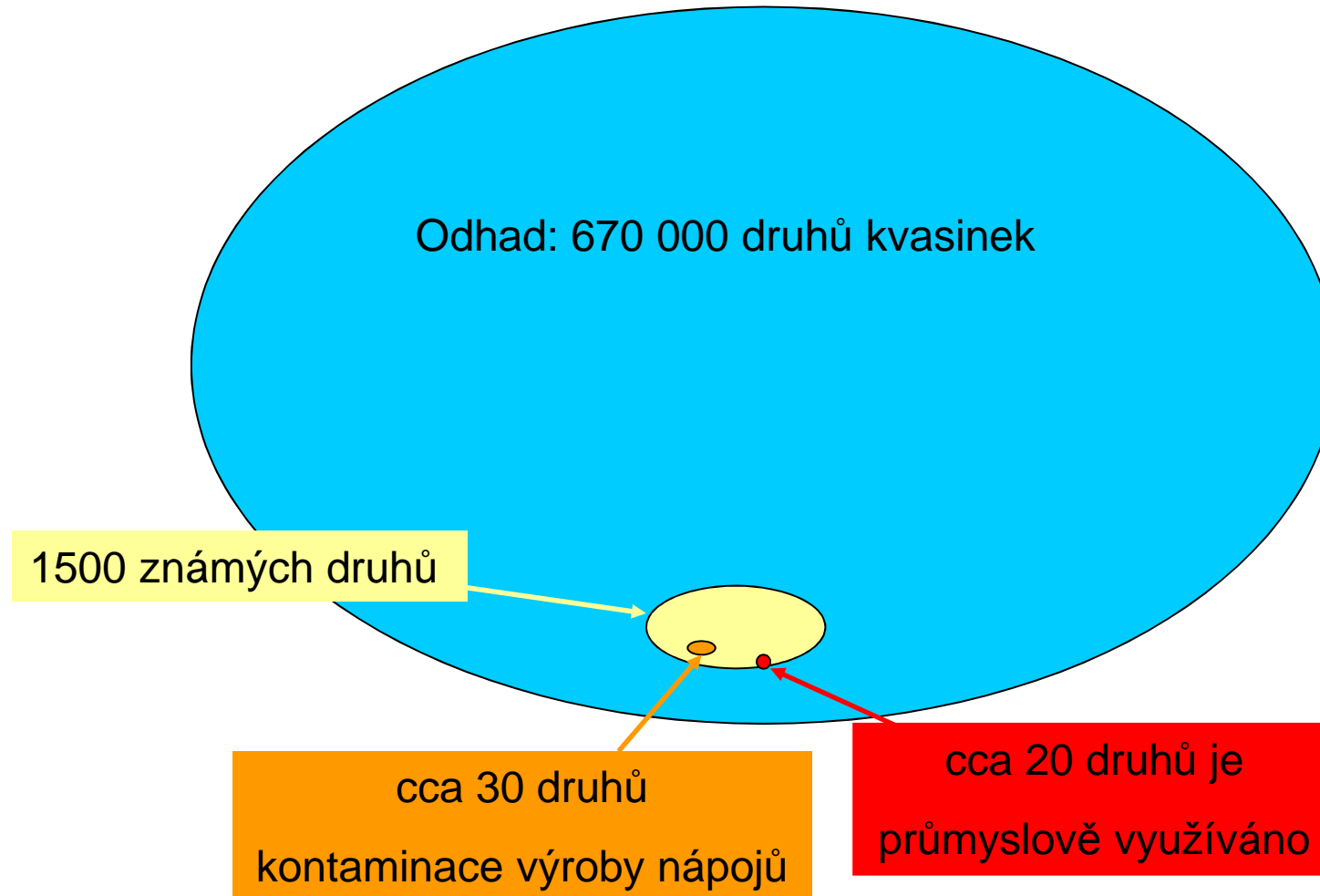
Jana Kopecká
223187@mail.muni.cz



Biotechnologie „klasická“ x rekombinantní



Úvod



Rekombinantní biotechnologie

- sekvenace *S. cerevisiae* v roce 1996
S. pastorianus v roce 2009
- snadná manipulace – podobné s bakteriemi (izolace mutantů, rychlost růstu, přítomnost plazmidu, ...)
- kultivace ve fermentoru
- *S. cerevisiae*, „*P. pastoris*“, *Yarrowia Lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, ...

Kvasinkové expresní systémy

- vhodná posttranslační modifikace proteinů eukaryotního původu, ale trochu jiné struktury N-glykanů → glykozylace
- možné připojení sekretorních signálů
- podíl sekretovaného proteinu z celkového množství proteinů syntetizovaných buňkou u *S. cerevisiae* 1%, „*P. pastoris*“ až 10%
- *S. cerevisiae* – eutropin (Lg Chemical), Hepatitis B vakcína (Glaxosmithkline), hirudin (Aventis), insulin (Novo-Nordisk)

Kultivace „*P. pastoris*“ *Komagataella pastoris*

- silný promotor pro alkoholoxidázu AOX – snadná indukce a regulace
- vnesení genu holomogní rekombinací (stabilnější než pomocí plazmidu)
- postranlační modifikace (odstranění signálních peptidů, glykozylace, tvorba disulfidových můstků)
- pro expresi velkých proteinů (>50 kD)

Kultivace „*P. pastoris*“

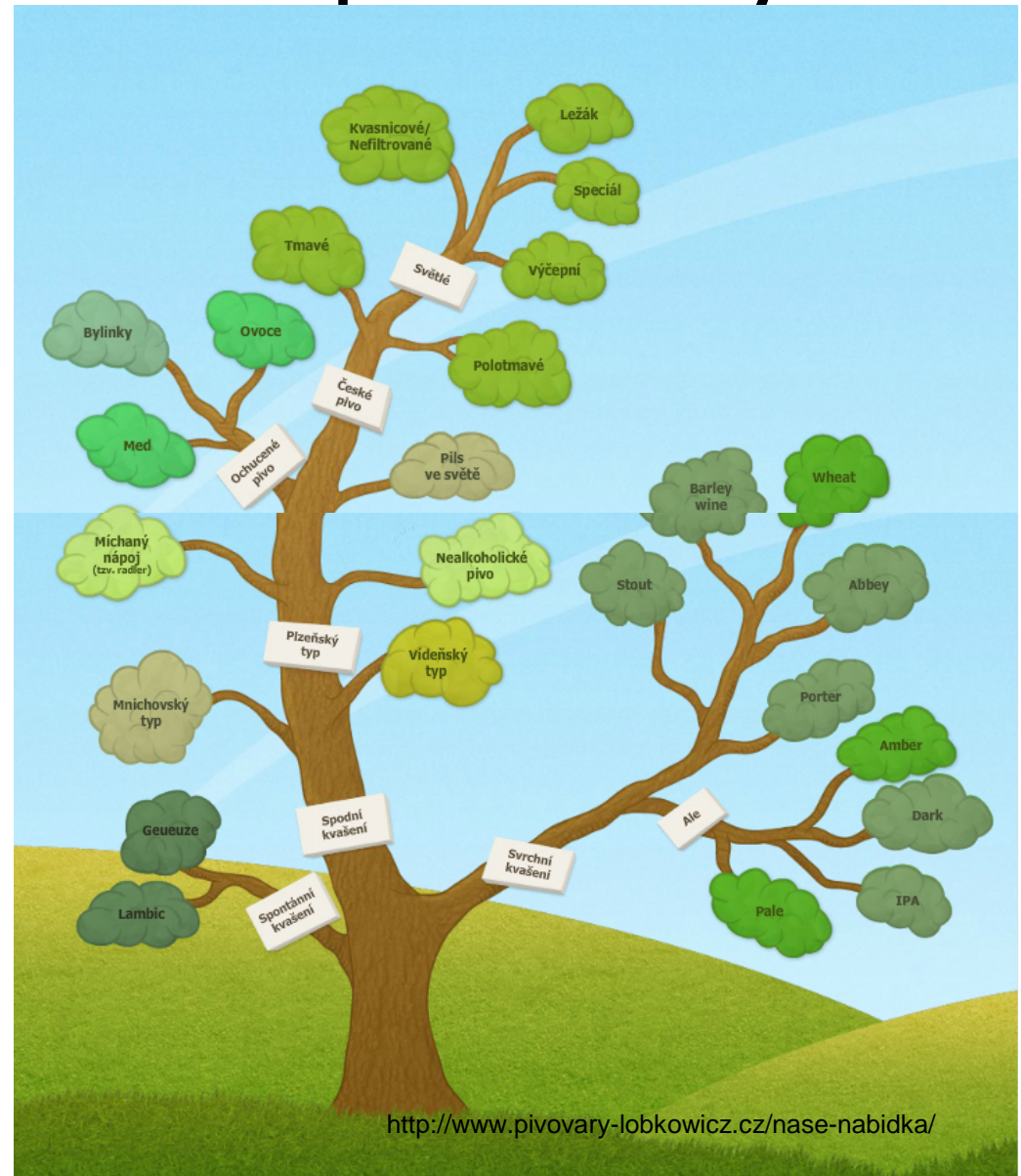
- 3-stupňový proces:
 - produkce biomasy (represe genové exprese) - glycerol
 - adaptační fáze - glycerol
 - produkční fáze – glycerol+metanol
- nutná optimalizace!!!
- sekretované i intracelulární proteiny
- velké denzity při kultivaci
- komerčně dostupný kit „*P. pastoris* Expression Kit“ (Invitrogen)

Klasické biotechnologie

- výroba piva
- výroba vína
- výroba pečiva
- výroba lihovin
- SCP = single cell protein (krmná biomasa)
- využití převážně *S. cerevisiae*

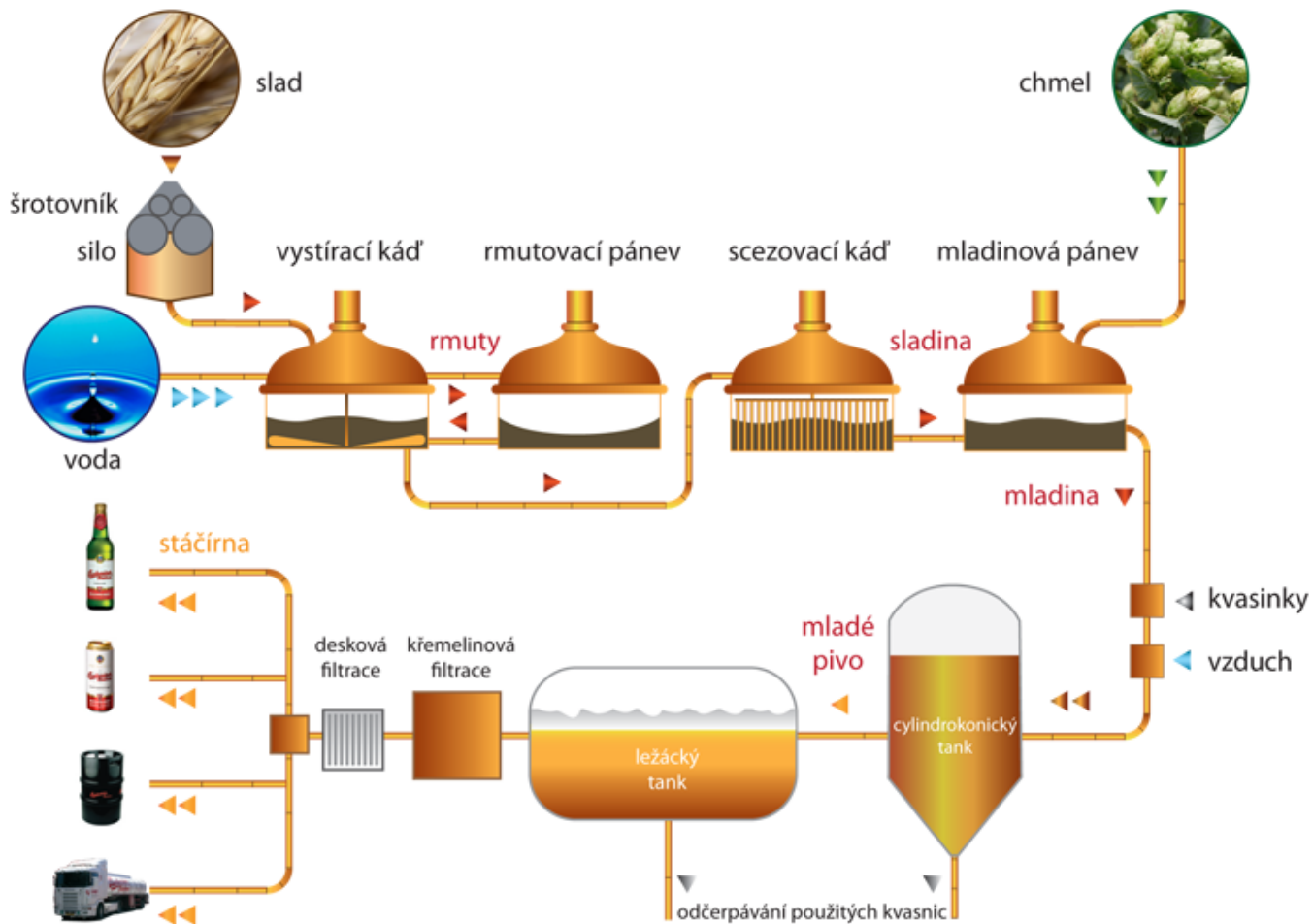
Různé typy piv = různé podmínky

- slad
- kvasnice
- kvašení
- doba zrání
- ...



Plzeňský typ - Budvar

Jak se vaří pivo u nás?



Český ležák

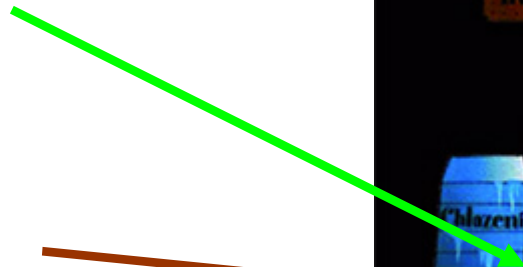


Fáze přípravy piva

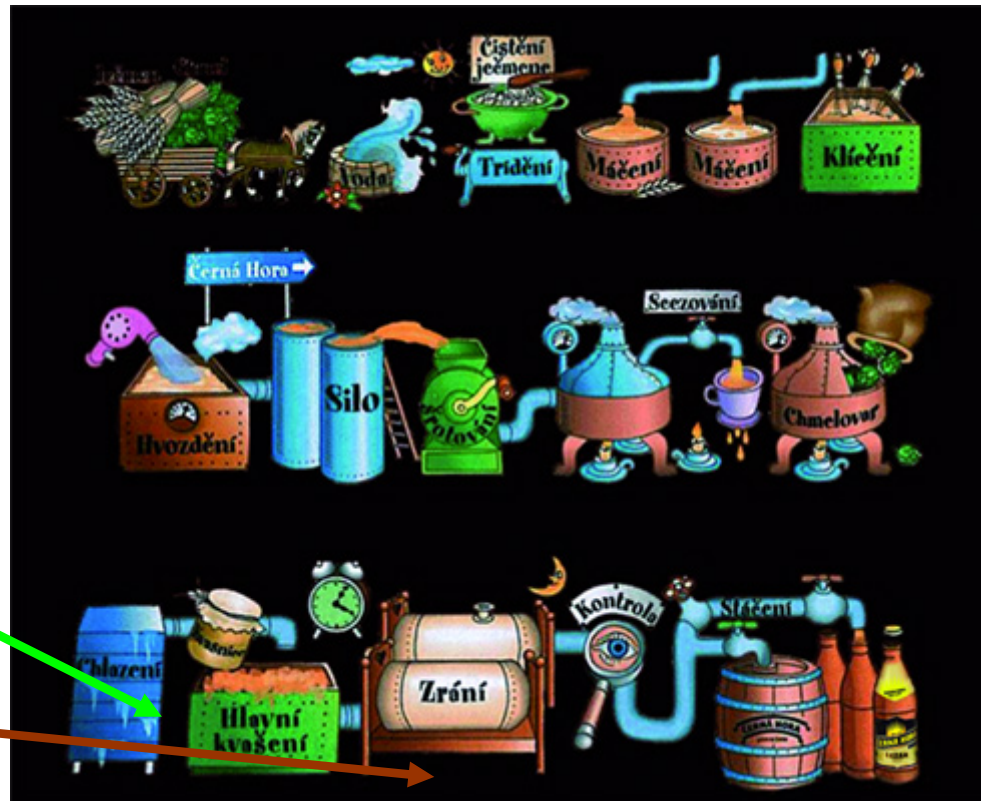
- příprava mladina



- hlavní kvašení



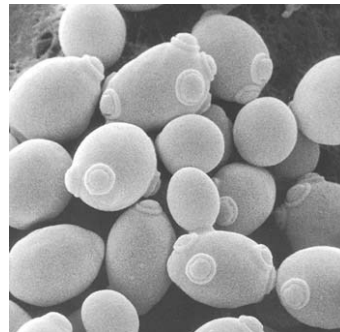
- dokvášení



<http://www.pivovarcernahora.cz/pivovar-a-okoli/jak-varime-nase-pivo/>

Pivovarské kvasinky

- kulturní kvasinky používané k produkci spodně či svrchně kvašených piv
- čistá kultura – vyrovnaný tvar (kulatý, oválný), stabilní vlastnosti
- technologicky odlišné druhy:
S. pastorianus (spodní) a *S. cerevisiae* (svrchní)
 - hybridní, polyploidní (tri- či tetraploidní), často i aneuploidní mikroorganismy
- genom: *S. cerevisiae* S288c: 12 Mb, 16 chromozomů (1996)
S. pastorianus W34/70: 25 Mb, 36 chromozomů, 2 subgenomy typu SC a SB, mt-genom typu SB (2009)



Pivovarské kvasinky

Pro každý typ piva jsou vhodné jiné kvasinky

(ležák, pšeničné pivo, IPA, ale, lambic, atd.)



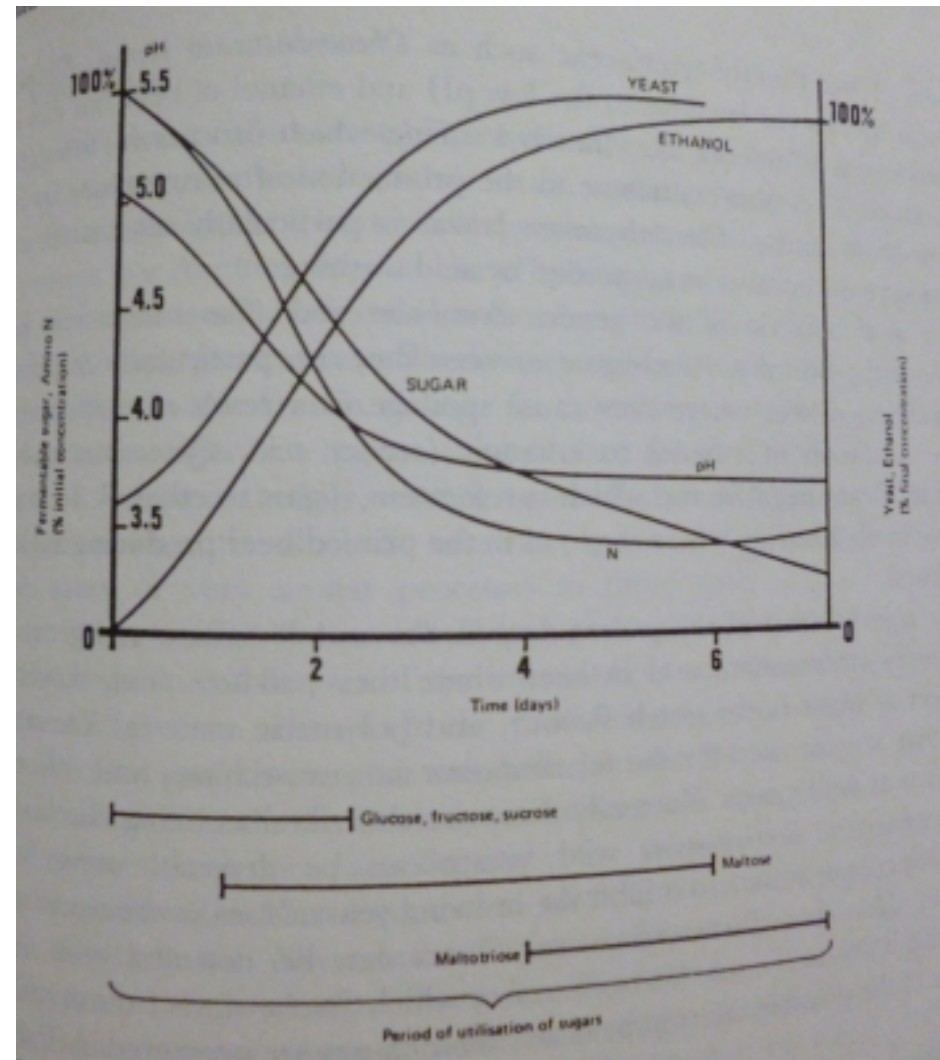
(<http://www.blq-weihenstephan.de/>)

Hlavní kvašení

- dle typu piva
 - spodní kvašení **6-12°C**
 - svrchní kvašení **17-25°C**
- zhruba **7 dní (spodní)**
(bílé kroužky, hnědé kroužky, flokulace a sedimentace kvasnic)

3 dny (svrchní)

!!jiný charakter piva pokud tank „leží“ či „stojí“



Hlavní kvašení – spilka



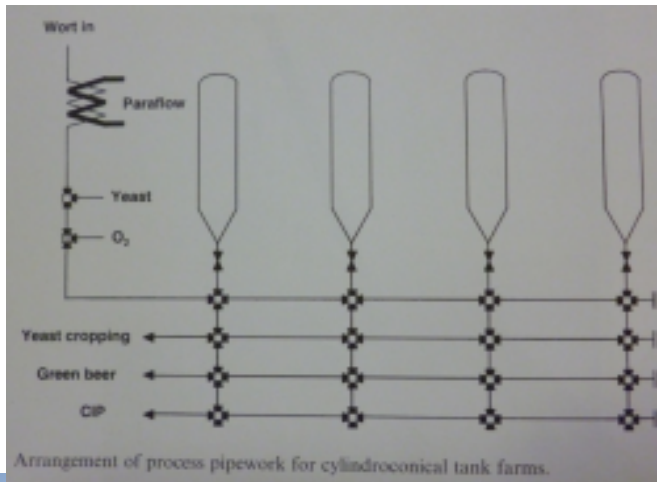
<http://www.protext.cz/english/zprava.php?id=11708>



Minipivovar Veselka, Litomyšl

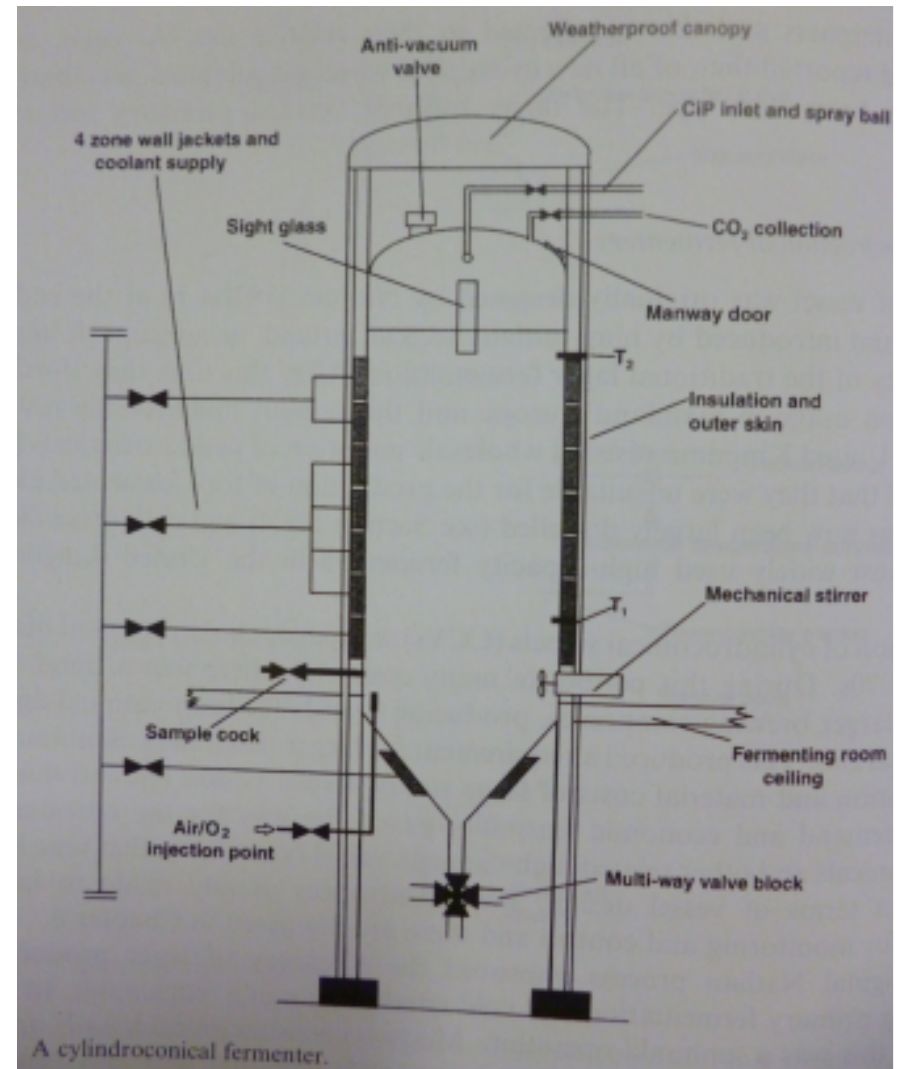


Hlavní kvašení – CK tanky



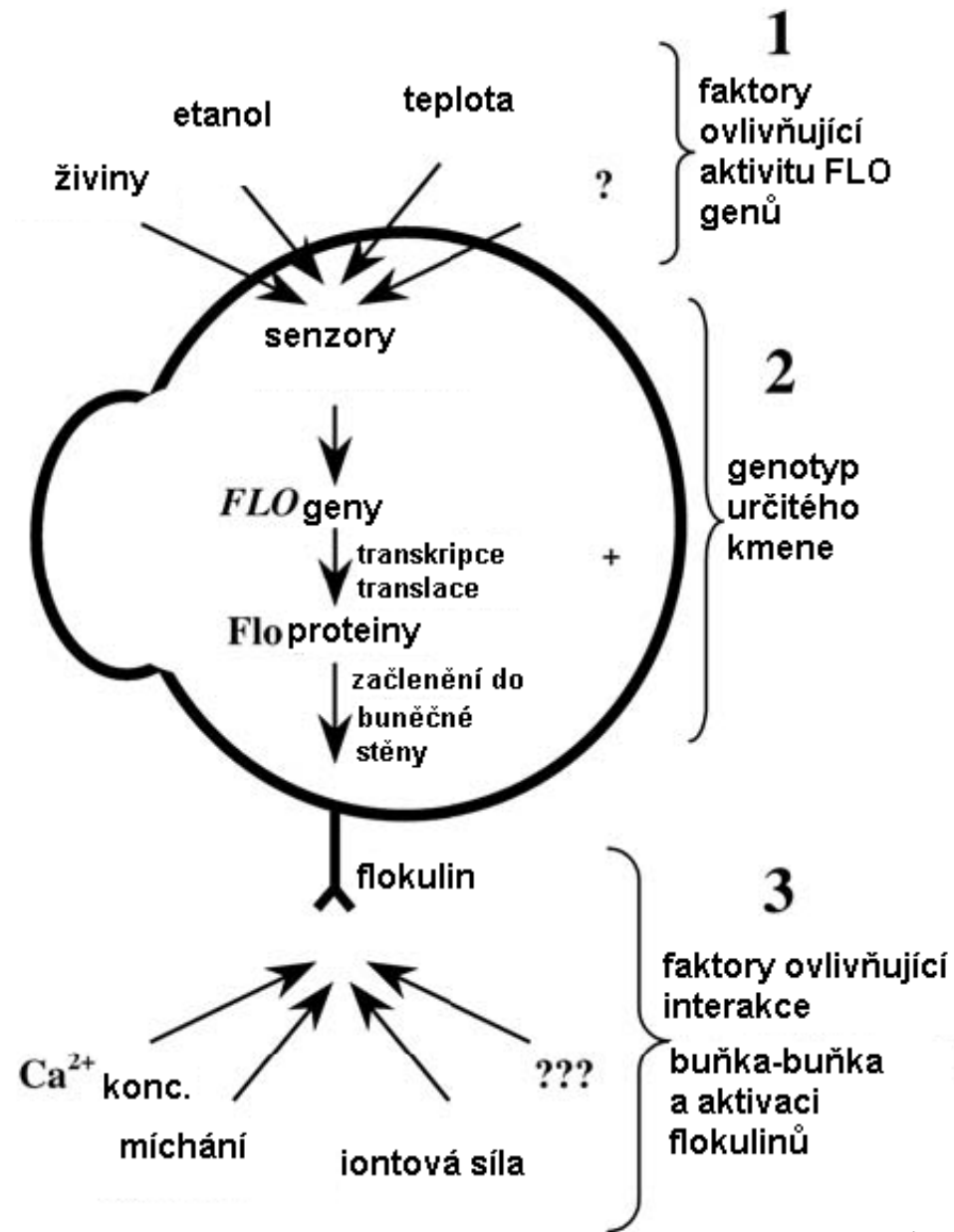
http://www.brewia.cz/index_4CZ.html

http://www.holidaycheck.cz/fullscreen-Pivovar+Velk%C3%A9+Popovice+CK+tanky-ch_ub-id_1159333861.html



Hlavní kvašení - flokulace

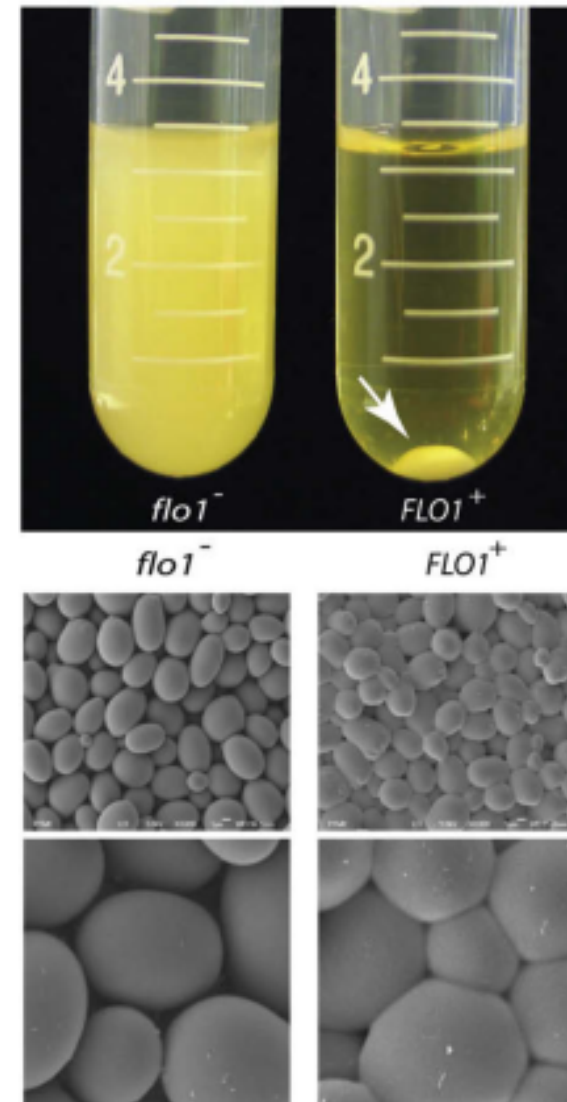
- reverzibilní schopnost kvasinek shlukovat se, tvořit větší celky (vločky, floky)
- !! na konci hlavního kvašení !!
- usnadňuje filtraci piva
- vliv složení média, genetické výbavy kmene (asi 33 genů), teploty, stavby a morfologie buňky...



(Verstrepen et al., 2003, upraveno)

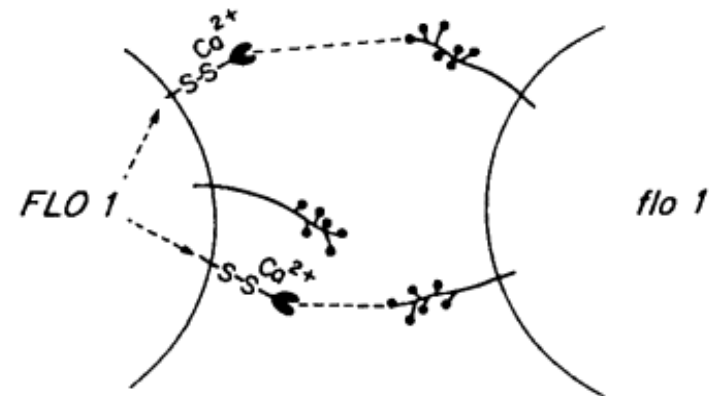
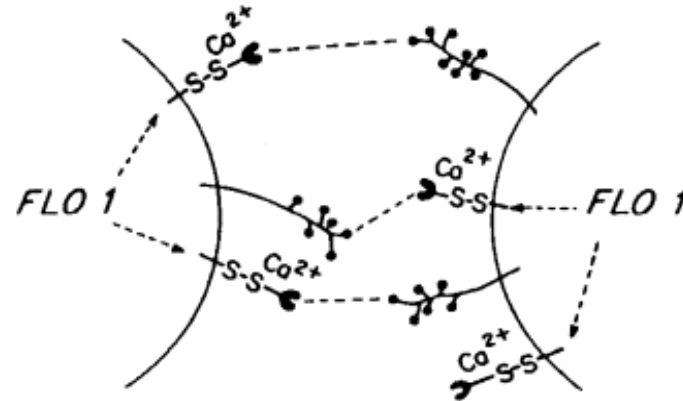
FLO geny

- geny *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10*, *FLO11*, *Lg-FLO* kódují zymolektin
- gen *FLO8* je transkripční aktivátor
- umístění blízko telomer
- nestabilní geny



Lektinová hypotéza - flokulace

- interakce lektinového typu (polysacharid – protein)
- specifická vazba zymolektinu na povrchu buňky na manózoové zbytky v **buněčné stěně** sousední buňky
- ionty Ca^{2+} jsou přímo zapojeny v uhlovodíkových vazbách
- (dříve se mělo za to, že udržují správnou konformaci zymolektinové vazebné sítě)

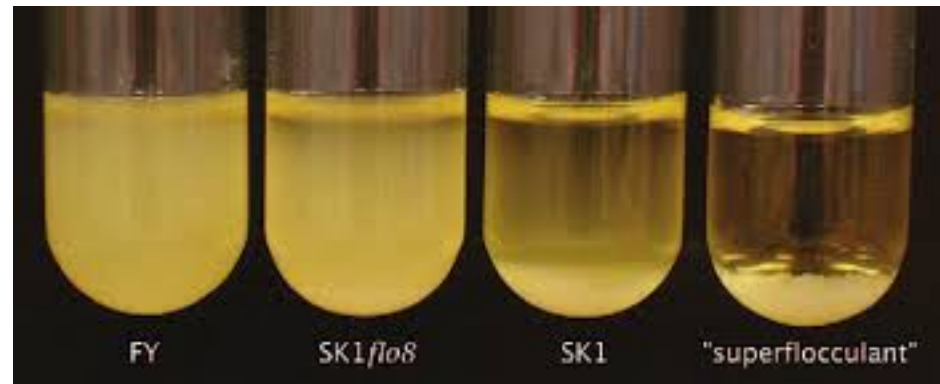


(Miki et al. 1982, upraveno)

Flokulační fenotyp

- **Flo1** – manóza senzitivní
 - laboratorní kmeny
- **NewFlo** – manózo/glukózo senzitivní
 - pivovarské kmeny
 - širší specifita zymolektinu
 - stacionární fáze růstu

(Brauer et al. 2006, DOI 10.1534)



Zrání piva a dokvášení

- dle stupňovitosti a typu piva!!!! (Weißbier, IPA, Ale, Porter, ležák,...)
- 3 a více týdnů za nízkých teplot (0,5-4°C)
- sycení piva, dotváření chuti
- CK tanky nebo ležácké tanky
- autolýza kvasinek je **nežádoucí**



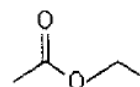
Dokvášení

Dotváření chuti

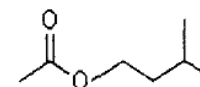
ležácký sud, CK tank (svisle, vodorovně)

- diacetyl (typický malý obsah pro česká piva)
- sycení piva CO_2
- pšeničná piva
(4-vinyl guaiacol „hřebíček“,
izoamylaetát „banán“, vanilin, atd.)

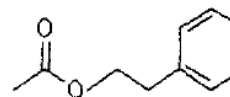
Ethyl acetate



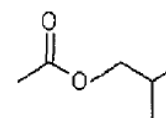
Isoamyl acetate



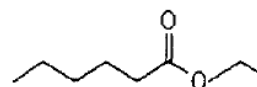
Phenyl ethyl acetate



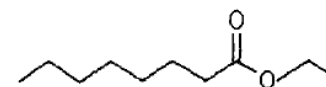
Isobutyl acetate



Ethyl caproate



Ethyl caprylate



v pivu bylo objeveno kolem 1000 různých látek, většina je sensoricky aktivní

- **silný charakter:**

říz (oxid uhličitý – vzniká kvašením)

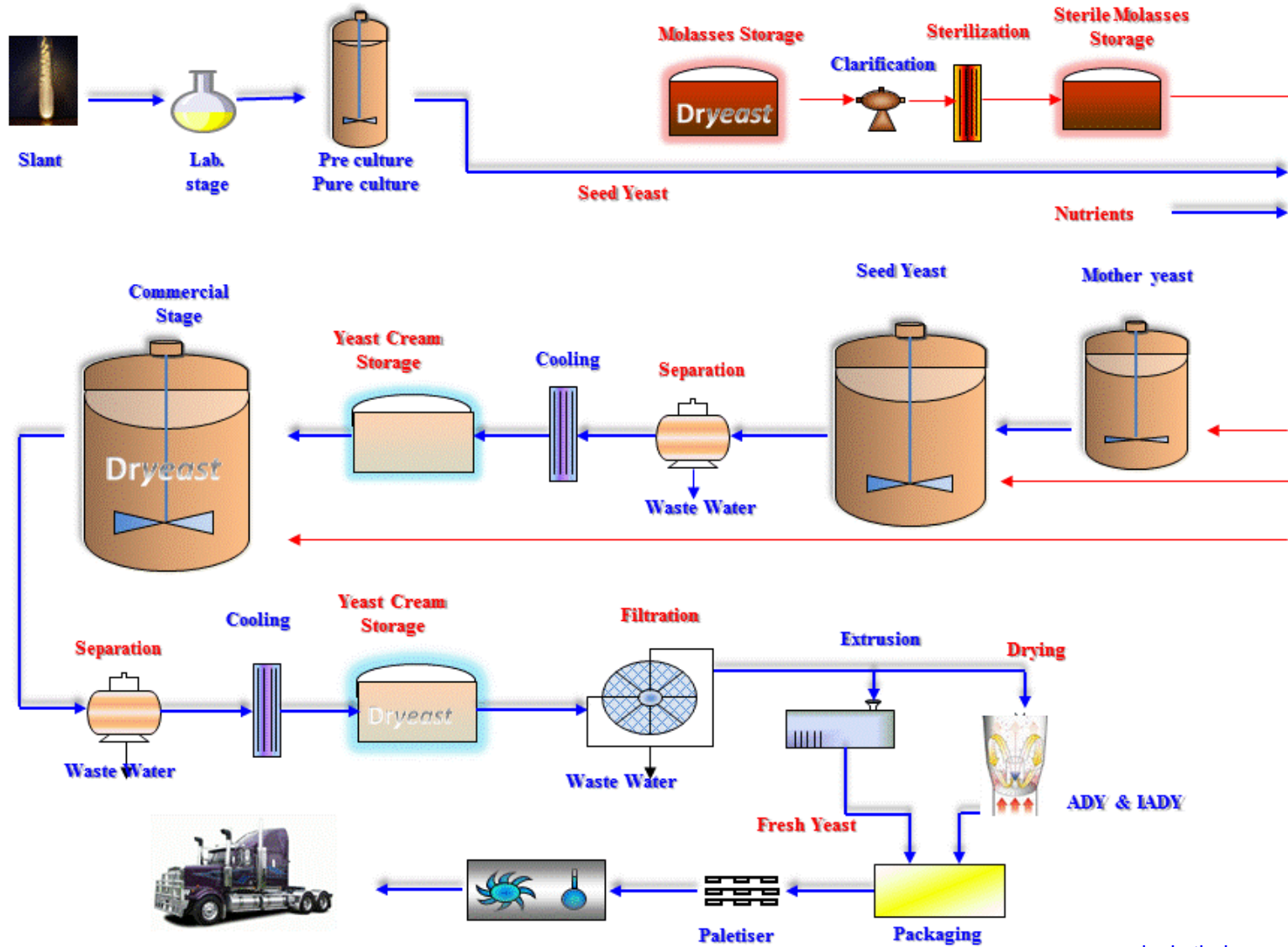
hořkost (ze chmele nebo chmelových produktů)

alkoholová (alkohol – vzniká kvašením)

- **střední charakter:** ovocná-esterová, diacetylová, po vyšších alkoholech, sladká, karamelová, DMS (dimethylsulfid), kyselá, oxidační, mastné kyseliny atd.

- **slabý charakter:** velká škála látek; některé z nich mohou být ze střední skupiny, pokud se projevují slabě

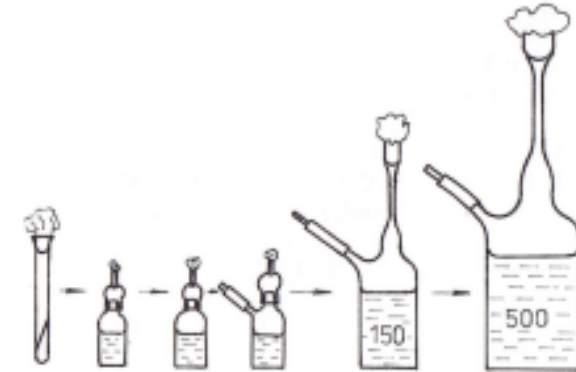
Propagace kvasnic



Propagace kvasnic



www.destila.cz



Obr. 16. Schéma propagace se sledem propagačních nádob
Kvasná mikrobiologie, Tvrdoh a Bálešová, 1982



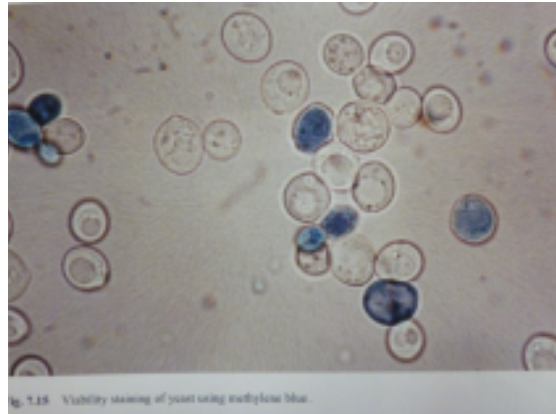
Pivovar Ježek

Vícenásobné použití kvasnic

- kvasinky lze po hlavním kvašení tzv. sebrat a použít znovu (ne do nekonečna) + nové
- kontrola kvasinek – viabilita
- vliv technologických stresů (teplota, promývání, stupňovitost mladiny, atd.)
- rozdíl u typů piv na požadavky !!!

Kontrola kvasinek

- vitální barvení



- acidifikační test



Spodní x svrchní pivovarské kvasinky

- ***S. pastorianus* (spodní)**

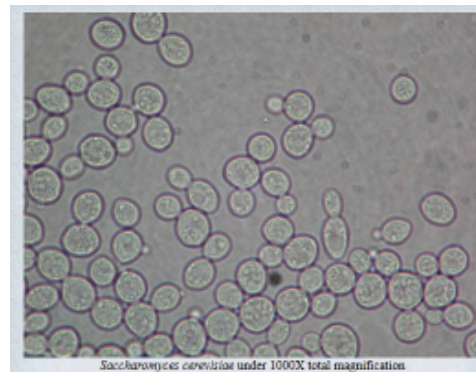
- hybridní původ
- hlavní kvašení při nižších teplotách (9-12°C) cca 7 dní



<https://microbewiki.kenyon.edu>

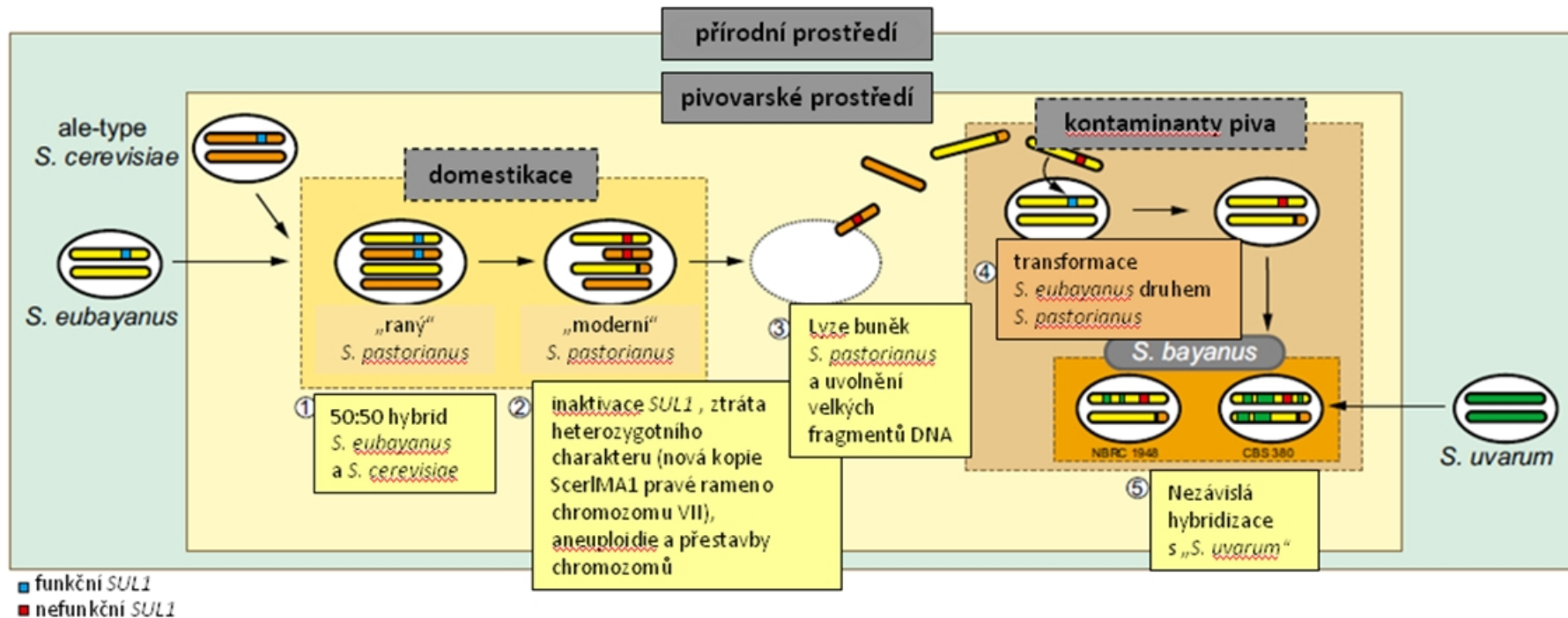
- ***S. cerevisiae* (svrchní)**

- hlavní kvašení při vyšších teplotách (18-22°C) cca 3 dny
- tvorba ovocných příchutí v pivu



<http://www.uwo.edu>

Model utváření hybridních druhů *S. pastorianus* a *S. bayanus* (Libkind et al., 2011)



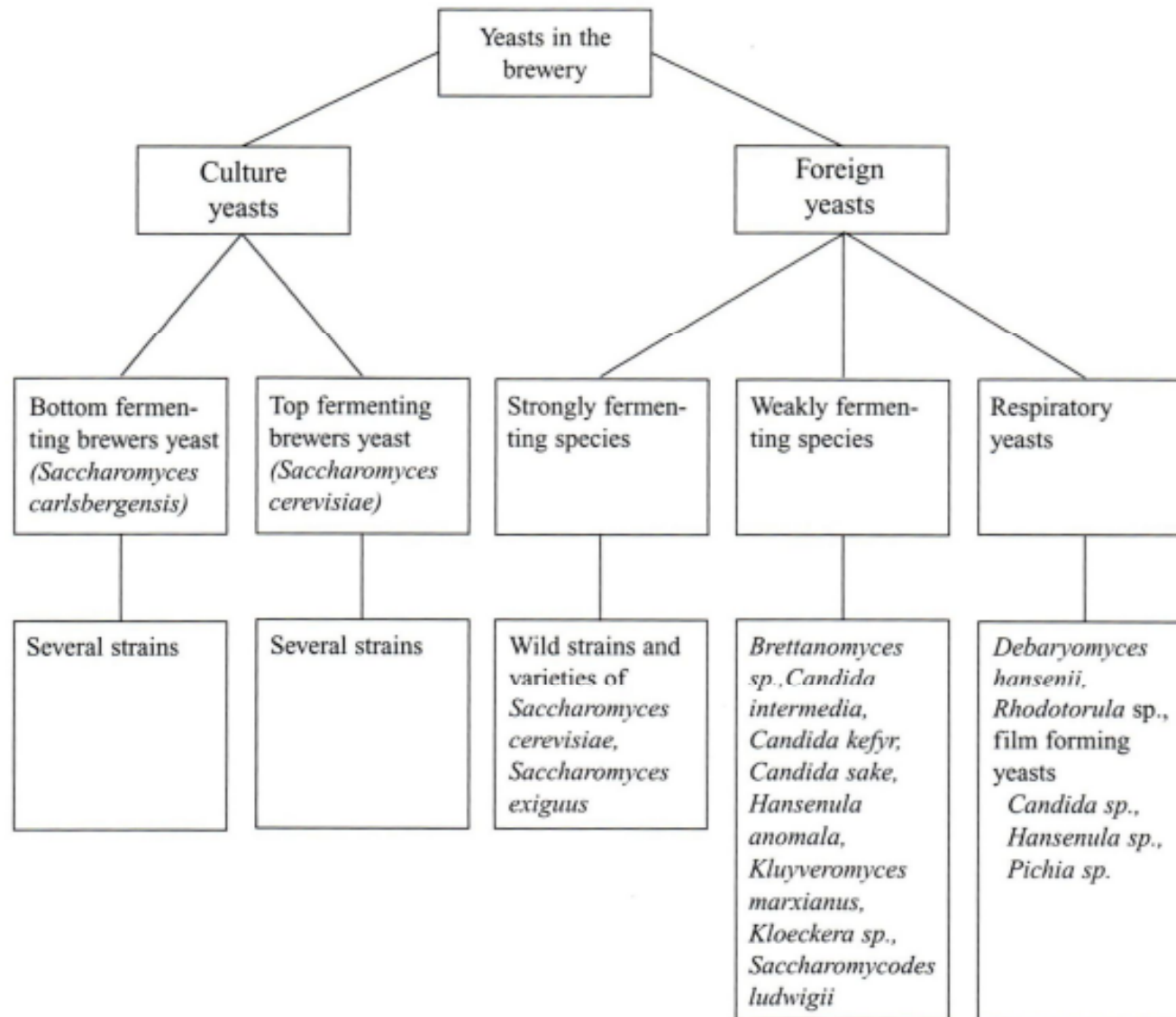
Odhadem více než 10 % kmenů klasifikovaných ve sbírkách jako *S. cerevisiae* může být přirozeným hybridem mezi *S. cerevisiae* a více či méně příbuznými druhy (Nguyen et al., 2011)

Kontaminace v pivovaru

- **bakterie** (aerobní i anaerobní)
- **kvasinky**, které nejsou využívány úmyslně a nejsou plně pod kontrolou
 - *non-Saccharomyces*: *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, ...
omezená schopnost růstu a množení za anaerobních podmínek a zkvašování cukrů
 - *Saccharomyces* (wild yeast) – těžké odlišení
produkce nežádoucích aromatických látek (fenolické), amylolytické vlastnosti
 - „killer kmeny“ *Saccharomyces* – toxin; usmrcení původního kulturního kmene
 - **RD mutanty** *Saccharomyces* – změny, ztráty či delece mtDNA

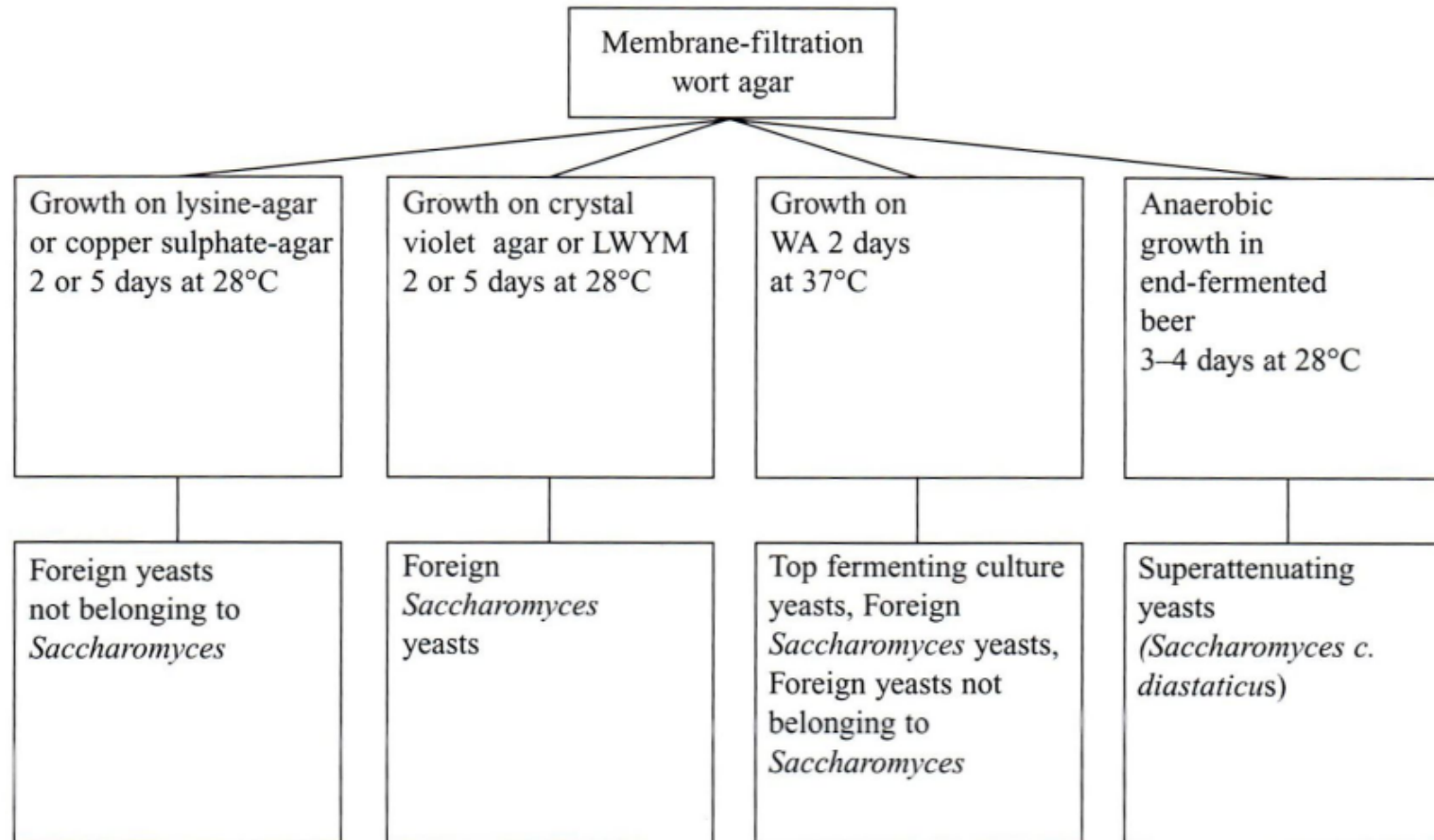
Klasifikace kvasinek

z pivovarského prostředí

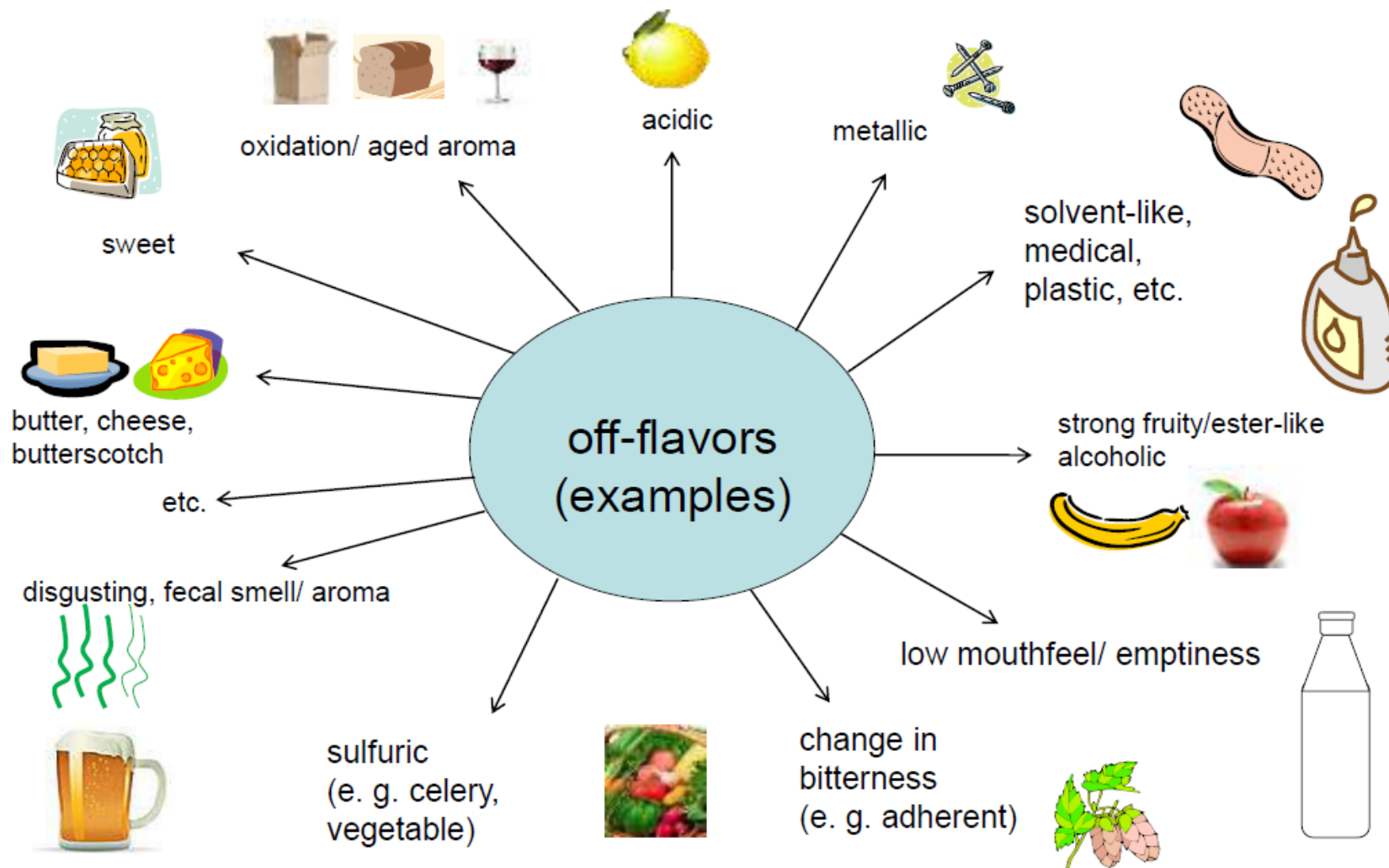


Rozlišení kvasinek

(kultury na membránových filtrech)



Mikrobiologická „čistota“



Vinařské kvasinky

- „čisté kvašení“ kulturními kvasinkami
 - *S. cerevisiae* a *S. bayanus*
- „spontánní kvašení“
 - kvasinky z **povrchu bobulí**: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Metchnikowa*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Rhodotula*, *Cryptococcus*, *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*...
 - nízká fermentační aktivita, ale na začátku kvašení dominují
 - tolerance jiných mikroorganismů
 - *Saccharomyces* – schopnost dominovat

Vinařské kvasinky - *Saccharomyces*

- tolerance k SO₂
- kvašení do 25°C po dobu 7-14 dnů
- **autolýza kvasinek přispívá k buketu vína**
- tolerance k alkoholu (11-14%)
- nízká koncentrace zbytkových cukrů (2-5 g/l)
- produkce žádoucích esterů
- nízká produkce těkavých kyselin

Vinařské kvasinky - *Saccharomyces*

- nejčastěji diploidní, homozygotní a homotalické
- chromozomové polymorfizmy (rekombinace Ty retrotranspozonů či subtelomerických oblastí)
- geny PAU: adaptace na stresové podmínky při výrobě vína, jsou regulovány anaerobními podmínkami
- jiný počet kopií genu než u laboratorních kmenů (převážně geny důležité pro kvašení: membránové transportéry, metabolismus etanolu, geny pro rezistence, atd.)

Vinařské kvasinky non-*Saccharomyces*

- **převážně aerobní:** *Pichia* spp., *Debaryomyces* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus albidus*
- **s nízkou fermentační aktivitou** (citronkovitý tvar buňky): *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), *Hanseniaspora guilliermondii* (*Kloeckera apis*), *Hanseniaspora occidentalis* (*Kloeckera javanica*)
- **s fermentativním metabolismem:** *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefir*), *Torulasporea delbrueckii* (*Candida colliculosa*), *Metschnikowia pulcherrima* (*Candida pulcherrima*), *Zygosaccharomyces bailii*
- **vliv na aroma vína:** terpenoidy, estery (160 esterů detekovaných ve víne), vyšší alkoholy (n-propanol, isobutanol, isoamyl alkohol, aktivní amyl alkohol;), glycerol, acetaldehyd, kyselina octová a jantarová, β -glukozidázová aktivita (uvolnění těkavých složek z netěkavých prekurzorů), terpenoly (citronelol, nerol a geraniol)

(Jolly et. al. FEMS Yeast Res, 2014)

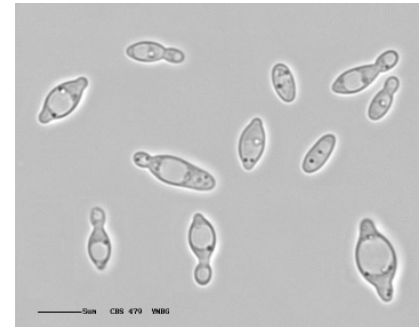
Vinařské kvasinky non-*Saccharomyces*

Pichia spp.



<http://www.kimchitech.co.kr>

Debaryomyces spp.

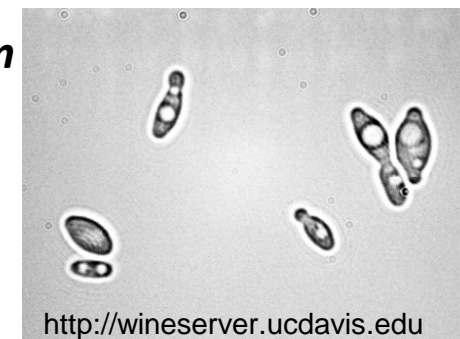


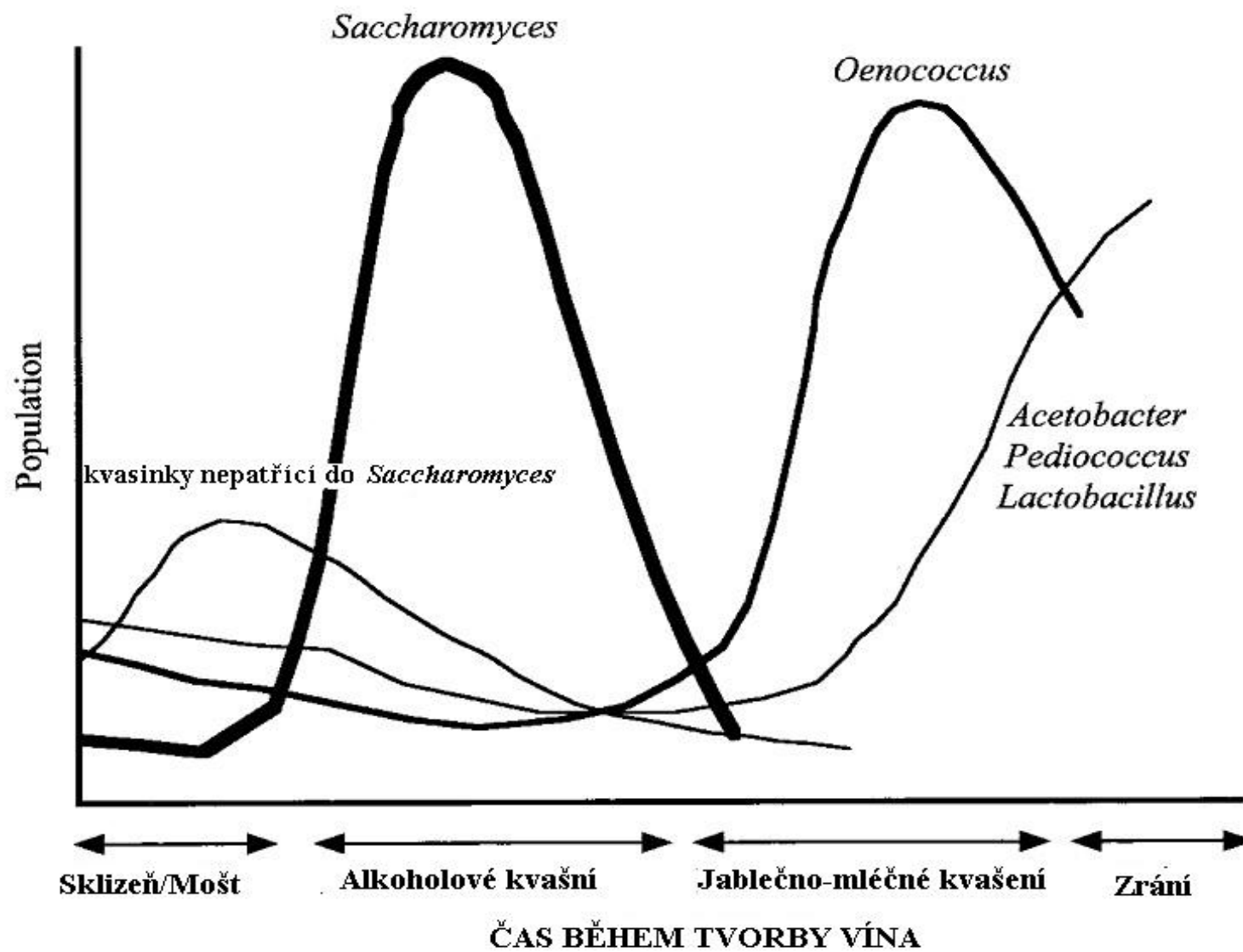
<http://www.tehnologijahrane.com>

Rhodotorula spp.

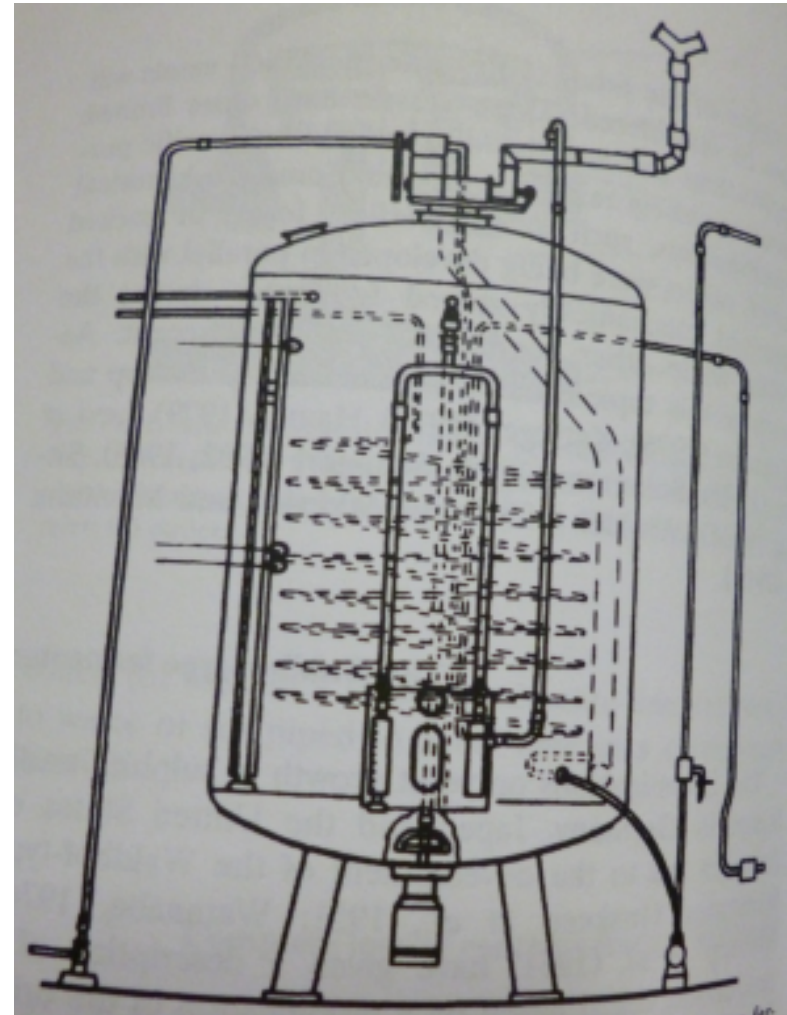
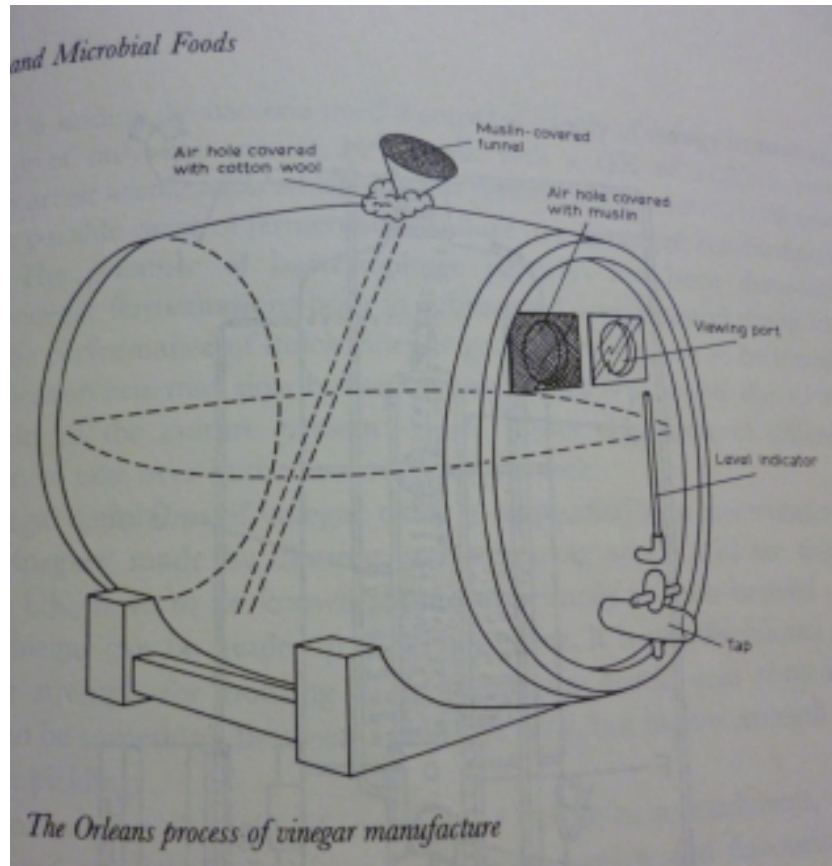


Hanseniaspora uvarum
(*Kloeckera apiculata*)





Fermentace vína



Pekařské kvasinky

- stálost technologických vlastností
- aerobní metabolismus
- aglutinace a **autolýza je nežádoucí** (trvanlivost)
- cílem je získat co největší biomasy
(rychlé množení, bez alkoholového kvašení)

Lihovarské kvasinky

- melasové zápary
- vysoká tolerance k alkoholu (až 11%) a teplotě
- vysoká rychlost kvašení 24-48 hod
- osmotolerance (využití koncentrovanějších melas)
- nežádoucí je aglutinace a sedimentace

SCP (Single Cell protein)

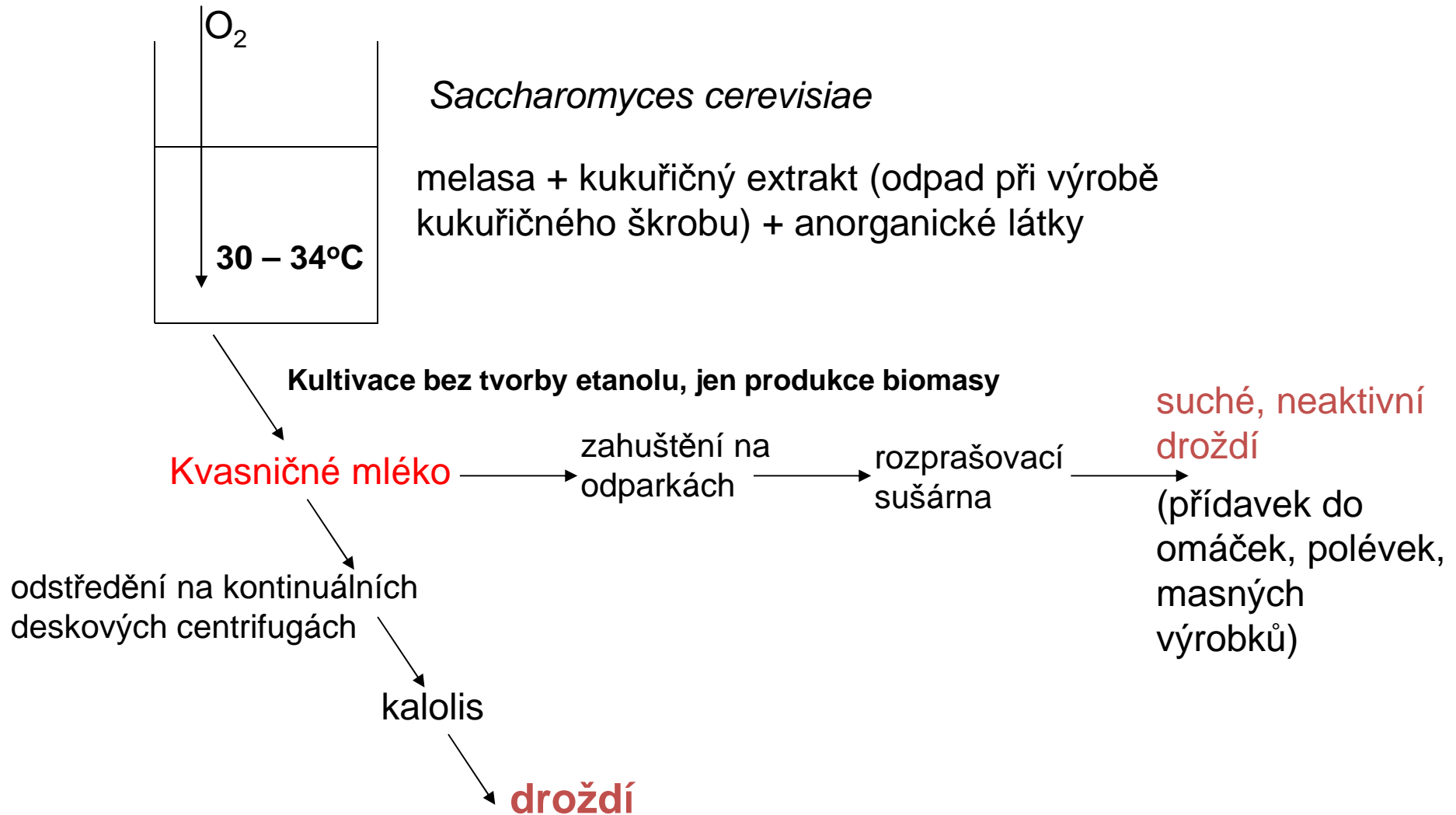
- *S. cerevisiae* - pro potravinářské účely sušení biomasy při vyšších teplotách → přísada do polévek, omáček, masných výrobků, ...
- pro krmivářské účely se využívá *Saccharomyces* ojedinele (většinou ke zkrmení nekvalitního droždí)
- využití i rodu *Candida* - produkce min. 50% bílkovin v sušině, menší nároky na výživu a tolerance medií s vyšším obsahem solí
Candida utilis, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. robusta*, *C. scottii*, *C. ingens*, *C. crusei*, *C. mogii*, *C. boidinii* atd.
- vyjímečně i ostatní kvasinkovité mikroorganismy jako *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorfa*, *Hansenula capsulata*, "*Pichia pastoris*"
- SCP (bakterie, kvasinky) obsahuje 70-80% hm. čistých bílkovin

SCP

- melasa – v současné době jen ve výjimečných případech
- lihovarské výpalky, sulfitové výluhy (po výrobě celulózy) nebo hydrolyzáty dřeva
- „citrolouhy“ (po výrobě kyseliny citrónové)
- syrovátka a další “odpady“ z potravinářské výroby, případně zemědělství
- n-alkany
- etanol, metanol – mohou být připraveny velmi čisté a získané SCP je nejvyšší kvality
- **mikrobní biomasa se vyznačuje vysokým obsahem nukleových kyselin (především RNA) v korelaci s obsahem bílkovin a pohybuje se v rozmezí 8-15% sušiny. Max. denní dávka pro člověka je 2 g nukleových kyselin, což odpovídá asi 20 g mikrobiální biomasy**

Výroba potravinářské biomasy – SCP

S. cerevisiae



Kde získat informace?

- Saccharomyces Genome Database

- www.yeastgenome.org

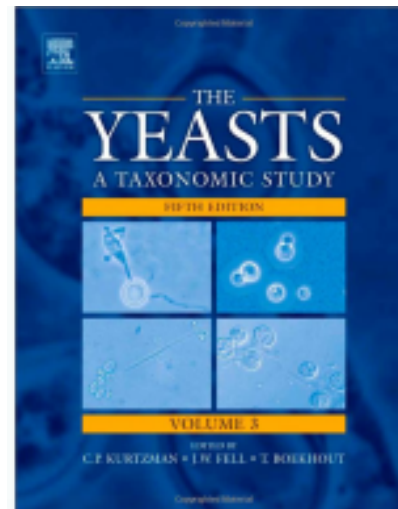


- Gene Ontology Consortium

- www.geneontology.org

- genomové sekvence, ale i funkční informace o genech ve spojení s jejich aminokyselinovou sekvencí

- odborné knihy a články



Kde získat kvasinky?

- **NCTC** National Collection of Type Cultures (UK)
- **NCIB** National Collection of Industrial Bacteria (UK)
- **DSMZ** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, (Německo)
- **CBS** Centraalbureau voor Schimmecultures (Holandsko)
- **CCM** Česká sbírka mikroorganismů (Brno)
- **RIBM** Výzkumný ústav pivovarský a sladařský (Praha)
- **CCDM** Sbírka mlékařských mikroorganismů
- **NCYC** National Collection of Yeast Cultures (UK)
- **TUM** Hefezentrum, Technische Universität München (Německo)
- nebo např. Pivní obchod OGAR Brno



Identifikace a rozlišení technologických kvasinek

- často velice problematické!!!
- produkční kmen x kontaminace
- tolerance k teplotám (30 x 37°C)
- mikroskopie, charakter růstu kolonií (pigment, selekční média)
- využití cukrů
- produkce nejrůznějších látek (diacetyl, pentadion, atd.)

Identifikace a rozlišení technologických kvasinek

- provozní laboratoř analýzu DNA a PCR nedělá
→ spolupráce s výzkumnými ústavami, univerzitami
- PCR a RFLP metody
 - ITS region, HIS4 gen, ...
- RFLP mtDNA
- karyotypizace

Multiplex PCR

pro v současné době platné druhy rodu *Saccharomyces*

- druhově specifické primery (Muir et al., 2011, FEMS Yeast Res:552-563)

M – marker

1 – *S. cerevisiae*^T

2 - *S. bayanus*^T

3 - *S. arboricola*^T

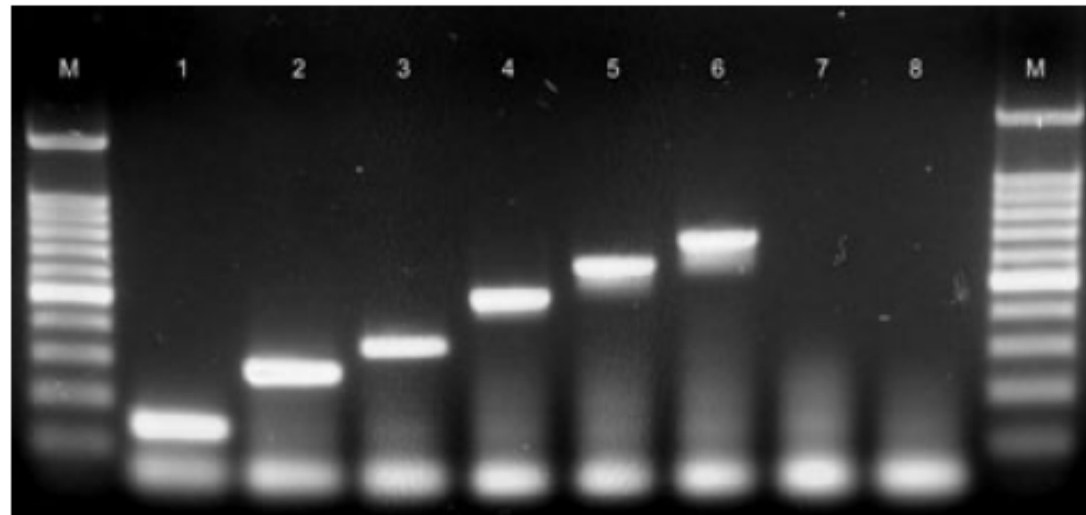
4 – *S. mikatae*^T

5 - *S. kudriavzevii*^T

6 - *S. paradoxus*^T

7 - *S. pastorianus*^T

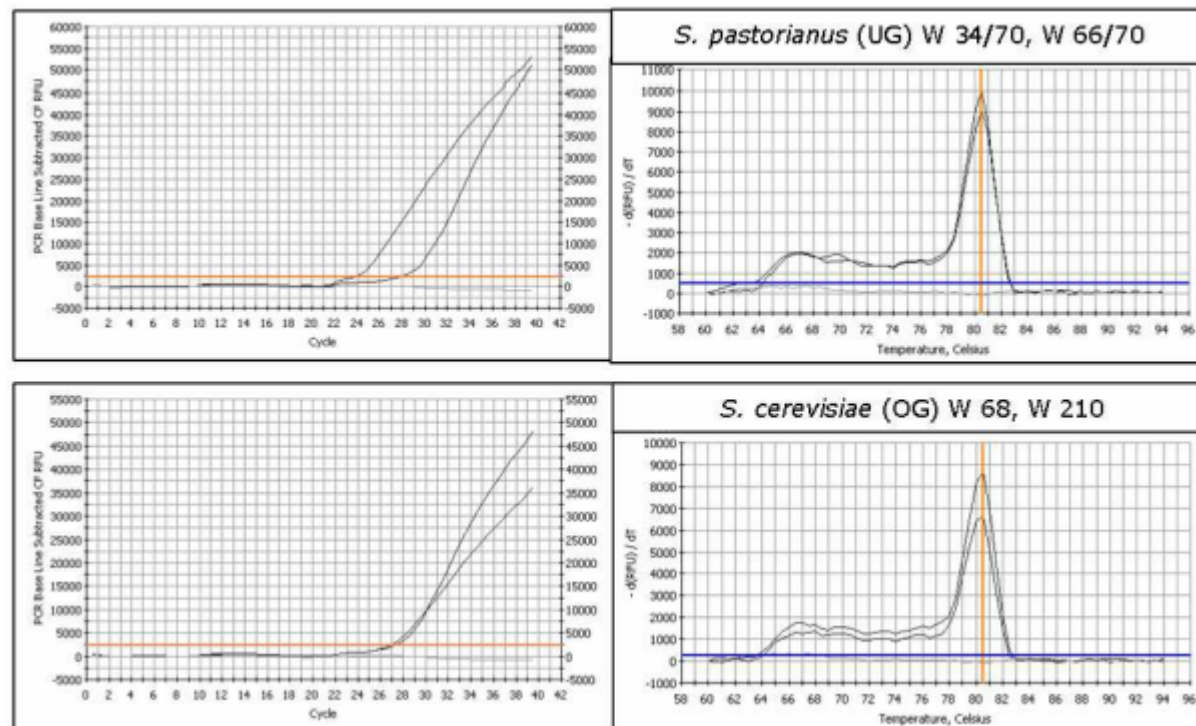
8 – negativní kontrola



S. eubayanus^T (primery dle Pengelly a Wheals, 2013, FEMS Yeast Res:156-161)

Real time PCR (Hutzler, 2010)

- systém pro rozlišení spodních a svrchních pivovarských kvasinek (UG LRE1; UG 300, OG; OG-Wein)
- identifikace spodních pivovarských kvasinek na základě úseku mtDNA



Tabulka pro real-time PCR

Art	Stamm	PCR-System					
		Sc-GRC3	Sce	OG-COXII	Sbp	UG-LRE1	UG-300
<i>S. bayanus</i>	DSM 70412T, 70547, BTII K 1-C-3	-	-	-	+	-	-
	70411, 70508	-	-	-	+	+	+
<i>S. bayanus/pastorianus</i>	CBS 2440, 6017	-	-	-	+	+	+
<i>S. pastorianus</i>	CBS 1503, 1513, 1538, DSM 6580NT, 6581	-	-	-	+	+	+
<i>S. pastorianus</i> (UG)	W 26, 44, 34/70, 34/78, 44, 54, 59, 69, 84, 105, 109, 120, 128, 168, 172, 180, 194, 199, 206 (Bruchhefen)	+	+	-	+	+	+
	W 71, 144 (Staubhefen) CBS 1484, 5832, CBS 6903, NBRC 2003, BTII K B-I-4, B-J-4, B-J-5						
	W 120 (Bruchhefe) W 66, 66/70, 204 (Staubhefen) CBS 5832, CBS 6903	+	+	-	+/-	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70424, 70449T, 70451, CBS 1464, 8803, BT II K 3-A-1, 3-C-3, 3-G-1, 5-A-7, 6-I-1, 6-F-4	+	+	+	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> (OG)	W 68, 127, 149, 175, 205, BTII K 5-A-8 (Weizenbier)	+	+	+	-	-	-
	W 148, 184, 208 (Altbier)	+	+	+	-	-	-
	W 165, 177 (Kölschbier)	+	+	+	-	-	-
	W 210, 211, 213 (Alebiere)	+	+	+	-	-	-
	W Bingen, Bordeaux, Eperney, Laureiro, Stein, Wädensvill (Wein)	+	+	+	-	-	-
	W B4 (Brennerei) W S2 (Sekt)	+	+	+	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	CBS 1782, DSM 70487, BTII K 1-B-8, 1-H-7, 2-A-7, K 2-F-1, 3-D-2, 3-H-2, 3-H-4	+	+	+	-	-	-
<i>S. cariocanus</i>	CBS 7995, 8841	-	+	-	-	-	-
	CBS 5313	+	+	+	-	-	-
<i>S. kudriavzevii</i>	CBS 8840	-	-	-	-	-	-
<i>S. mikatae</i>	CBS 8839	-	-	-	-	-	-
<i>S. paradoxus</i>	CBS 406, 432, 2908, 5829, 7400, 8436	-	+	-	-	-	-